

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2013-YL-061

**PERKLORETİLEN (PERC)'İN SİTOTOKSİK VE İN-
VİTRO GENOTOKSİK ETKİSİNİN FARKLI TEST
SİSTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ümit ÜNSAL

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

AYDIN

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ümit ÜNSAL tarafından hazırlanan “Perkloretilen (PERC)’in Sitotoksik Ve in-vitro Genotoksik Etkisinin Farklı Test Sistemleri İle Araştırılması” başlıklı tez, tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan:	Prof. Dr.Gökay Bozkurt BOZKUR	ADÜ
Üye	Doç. Dr. Serdar KOCA	ADÜ
Üye	Yrd. Doç. Dr. Tülay ÇELİK	ADÜ

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans Tezi Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Cengiz ÖZARSLAN

Enstitü Müdürü

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

...../...../.....

Ümit ÜNSAL

ÖZET

PERKLORETİLEN (PERC)'İN SİTOTOKSİK VE İN-VİTRO GENOTOKSİK ETKİSİNİN FARKLI TEST SİSTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Ümit ÜNSAL

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK
2013, 104 sayfa

Bu çalışmada, Aydın Bölgesi'nde bulunan kuru temizleme işyerlerinde çalışan uzun süreli perkloroetilen (PERC)'e maruz kalan bireylerin ve PERC'in 1mM, 3mM ve 5mM'daki 3 ayrı konsantrasyonların insan lenfositleri üzerindeki in vitro etkileri araştırılmıştır. Çalışmada; in vitro kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonu (KA) ve sitokinez blok mikronukleus (MN) teknikleri kullanılmış ayrıca mitotik indeks (MI) ve proliferasyon indeksi (PI) hesaplanmıştır. Ayrıca saf haldeki perkloroetilen'in sitotoksik etkisinin olup olmadığı da Brine Shrimp (*Artemia salina*) Letality Assay ile araştırılmıştır.

Sonuçta, PERC'in kullanılan konsantrasyon aralıklarında (10, 100, ve 1000 ppm) *Artemia salina* larvaları üzerinde sitotoksik olmadığını saptanmıştır. PERC'in periferik kan lenfositleri üzerine uygulanan 3 ayrı konsantrasyonun da (1mM, 3mM ve 5mM) KKD, KA ve MN oluşumunda doza bağlı olarak anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca, RI ve MI değerlerin de yine doza bağlı bir artışla istatistiki olarak önemli derecede azaldığı ve DNA replikasyonunun olumsuz yönde etkilendiği görülmüştür. Bu değerler sonucunda da PERC'in periferik kan lenfositleri üzerinde in vitro genotoksik bir risk oluşturduğu saptanmıştır.

Kuru temizleme işyerlerinde uzun süreli PERC'e maruz kalmanın genel olarak KKD sayısında ve KA sayısında negatif kontrole göre anlamlı artışa neden olmadığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı saptanmıştır. Ancak MN sayısında ise negatif kontrole göre anlamlı bir artışa neden olduğu pozitif kontrole göre ise, bu artışın önemli olmadığı saptanmıştır. Bunun yanında, uzun süreli PERC'e maruz kalmanın insan periferik lenfositlerinde RI ve MI'si negatif kontrole göre istatistiki olarak önemli derecede azaltmadığı ve DNA replikasyonunu pozitif kontrol kadar olumsuz yönde etkilemediği hesaplanmıştır. Ayrıca, PERC'e uzun süreli maruz kalmanın insan periferik lenfositlerinde mikronukleus oluşumunu uyardığı ve mikronukleuslu hücre oranının kontrole nazaran daha yüksek olduğu bulunmuştur

Anahtar Sözcükler: İnsan periferik lenfositleri, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonu (KA), Mikronukleus (MN), Perkloroetilen

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CYTOTOXIC AND IN VITRO GENOTOXIC EFFECTS OF PERCHLOROETHYLENE (PERC) BY USING DIFFERENT TEST SYSTEMS

Ümit ÜNSAL

M.Sc. Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assos. Prof. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK

2013, 104 sayfa

In this study, the in vitro effects of 3 different concentrations of Perchloroethylene (PERC) 1mM, 3mM and 5mM on human lymphocytes of the individuals who are working in dry cleaning enterprises in Aydın and who are exposed to (PERC) for a long time, are surveyed. In the study, Sister Chromatid Exchange (SCE), chromosomal aberration (CA) and cytokinesis block micronucleus (MN) techniques are used and mitotic index (MI) and proliferation index (PI) are calculated. In addition, whether the pure PERC has cytotoxic effect or not is surveyed via Brine Shrimp (*Artemiasalina*) Lethality Assay.

In the end, it is concluded that the concentration ranges of used PERC (10, 100 and 1000 ppm) do not have a cytotoxic effect on *Artemia salina* larvae. It is detected that in the 3 different concentrations (1mM, 3mM and 5mM) in the SCE, CA and MN assay, there is a reasonable increase resulting from damage. In the 3 different concentrations (1mM, 3mM and 5mM) of PERC applied to peripheral blood lymphocytes. In addition it is seen that RI and MI values with an increase resulting from the damage again, decrease with a statistically significant amount and DNA replication is affected negatively. As a result of these values; it is detected that PERC creates an in vitro genotoxic risk on peripheral blood lymphocytes.

Being exposed to PERC in dry cleaning enterprises for a long time does not cause a reasonable increase in SCE and CA numbers generally according to negative control and this decrease is observed as statistically significant. Yet, it has a significant increase in MN number according to negative control whereas it is not significant according to positive control. Besides, it is calculated that according to negative control; being exposed to PERC for a long time does not cause a statistically significant decrease in human peripheral lymphocytes RI and MI and it does not affect DNA replication negatively as much as positive control does. Moreover being exposed to PERC for a long time stimulates micronucleus occurrence in human peripheral lymphocytes and it is found that the rate of cells with micronucleus is higher than the one in the control.

Key Words: Human peripheral blood lymphocytes, Sister Chromatid Exchange (SCE), Chromosome Aberration (CA), Micronuclei (MN), Perchloroethylene

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve çalışmalarım süresince bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Yrd. Doç. Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen, araştırmanın tüm aşamalarında bana yardımcı olan, bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Arş. Gör. Dr. Özlem ASLANTÜRK'e teşekkür ederim.

ADÜ Uygulama ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Genetik Laboratuvarın da beraber çalıştığım ve her türlü yardımlarını gördüğüm başta Biyolog Metin ÇALIŞKAN'a ve Biyolog Cansu SEVİM'e, araştırmalarım süresince yardım ve desteklerinin yanı sıra, güler yüzlerini benden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Gökay BOZKURT'a ve tüm Tıbbi Genetik Laboratuar çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmalarım sırasında fikir ve görüşlerine başvurduğum Sayın Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na ve laboratuardaki yardımlarından dolayı Biyolog Semih UZUNHAN'a teşekkür ederim.

Tez projemizi (FEF-12030 No.lu Proje) destekleyen Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ve doğduğum andan bugüne kadar beni özveriyle yetiştiren, maddi manevi her konuda destek olan aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
SİMGELER DİZİNİ.....	xvii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ..	1
2. KONU VE AMAÇ.....	4
3. GENEL BİLGİ	7
3.1. Perkloretilen (PERC)	7
3.1.1. Genel Özellikleri	7
3.1.2. Kullanım Alanları.....	7
3.2. <i>Artemia salina</i> (Brine shrimp).....	8
3.2.1. Organizmanın Özellikleri.....	8
3.2.2. <i>Artemia</i> Yumurta Yapısı	9
3.2.3. Brine-shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality (BSL) Assay	13
3.2.4. Kromozomların İncelenmesi	15
3.2.5. Kromozom Aberasyonu (KA) Testi	16
3.2.6. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi	17
3.2.7. Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronukleus (MN) Testi	19
4. KAYNAK ÖZETLERİ	24
5. MATERYAL VE YÖNTEM	31
5.1. Test Materyali	31

5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	31
5.2.1. Perkloretilen (PERC).....	31
5.2.2. Mitomycin C (MMC)	32
5.2.3. Dimetil Sülfoksit (DMSO)	32
5.2.4. Kromozom Medyumu	32
5.2.5. Kolsemid.....	33
5.2.6. Sitokalsin B.....	33
5.2.7. 5'-Bromo 2'- deoksiüridin (BrdUrd).....	34
5.2.8. Hipotonik Eriyik.....	34
5.2.9. Fiksatif.....	34
5.2.10. Sorensen Tamponu	35
5.2.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği	35
5.2.12. Giemsa.....	35
5.2.13. Entellan.....	36
5.2.14. Nitrik Asit (HNO ₃)	36
5.3. Yöntem/Araştırma Teknikleri.....	36
5.3.1. Perkloretilen (PERC)'in Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality Assay (BSL) ile Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi.....	36
5.3.2. Perkloretilen'in Kuru Temizleme Çalışanları Periferik Lenfositleri Üzerindeki in vitro Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi	39
5.3.2.1. Deney ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi.....	39
5.3.2.2. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) ve Kromozomal Anormallikleri (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	39
5.3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	39
5.3.2.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması	41
5.3.2.2.3. Mikroskopik inceleme	42

5.3.2.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)/Hücre Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması	42
5.3.2.2.4.1. KKD/Hücre Sayısının Saptanması	42
5.3.2.2.4.2. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi = PI) Saptanması	43
5.3.2.2.5. Kromozom Aberasyonu (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.	48
5.3.2.2.5.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması	48
5.3.2.2.5.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması	49
5.3.2.3. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, PERC'in Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması	49
5.3.2.3.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve PERC'in Kültüre İlave Edilmesi	49
5.3.2.3.2. Preparatların Boyanması	51
5.3.2.3.3. Mikronukleus Sayımı İçin Mikroskopik İncelemenin Yapılması	51
5.3.2.3.4. Mikronukleus Sayısının Saptanması	51
5.3.2.3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme	52
5.3.3. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	52
6. BULGULAR	53
6.1. Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality (BSL) Assay	53
6.2. PERC ile Direk Muamele Edilmiş Periferal Kan Lenfositlerindeki in vitro Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi	54
6.2.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkiler	54
6.2.2. Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkiler	57
6.2.3. DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkiler	59
6.2.4. Mikronukleus (MN) Üzerindeki Etkiler	63
6.3. Perkloretilen (PERC)'in Kuru Temizleme Çalışanlarında Periferal Kan Lenfositlerindeki, in vitro Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi	65
6.3.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkiler	65

6.3.2. Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkiler.....	68
6.3.3. DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkiler	72
6.3.4. Mikronukleus Oluşumu Üzerindeki Etkiler.....	75
7. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	79
KAYNAKLAR.....	87
ÖZGEÇMİŞ.....	105

SİMGELER DİZİNİ

BrdUrd	5'-bromo-2'-deoksiuridin
BSL	Brine Shrimp Lethality Assay
CBMN	Sitokinez Bloklü Mikronükleus
cDNA	Tamamlayıcı (Complementary) Deoksiribo Nükleik Asit
Cyt-B	Cytochalsin-B (Sitokalsin-B)
dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dT	Deoxytimidin (Deoksitimidin)
dU	Deoxyuridin (Deoksiüridin)
Frek	Frekans
HCFC	Hydrochlorofluorocarbon (Hidrokloroflorokarbon)
KA	Kromozom Aberasyonu
KCL	Potasyum klorür
KKD	Kardeş Kromatid Değişimi
LC₅₀	%50 Öldürücü Konsantrasyon
MI	Mitotik İndeks
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
MMC	Mitomycin - C (Mitomisin - C)
MN	Mikronükleus
M1	Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı
M2	İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı
M3	Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı
NaCl	Sodyum Klorür
Ort	Ortalama
PERC	Perchloroethylene (Perkloretilen)
PI	Proliferasyon İndeksi
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RI	Replikasyon İndeksi
SCE	Sister Chromatid Exchange (Kardeş kromatid değişimi)
SE	Standart Error (Standart Hata)

SSC	Standard Saline Citrate
SH	Standart Hata
SS	Standart Sapma
UV	Ultraviole (Morötesi)
TCE	Trichloroethylene (Trikloretilen)
vd	ve diđerleri
WHO	Dünya Sağlık Teşkilatı (World Health Organisation)
°C	Santigrat Derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. PERC'in kimyasal yapısı	7
Şekil 3.2. <i>Artemia salina</i> genel görünümü	8
Şekil 3.3. Henüz olgunlaşmamış <i>Artemia</i> yumurtası	10
Şekil 3.4. Dış ortama atılmış <i>Artemia salina</i> yumurtası.....	11
Şekil 3.5. Ticari olarak satılan <i>Artemia salina</i> yumurtaları	11
Şekil 3.6. <i>Artemia salina</i> yumurtaları ve yumurtadan çıkıp serbest yüzen nauplii'ler.....	12
Şekil 3.7. <i>Artemia salina</i> yaşam döngüsü	12
Şekil 3.8. Harlequin Kromozomları	18
Şekil 3.9. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler ...	20
Şekil 3.10. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu	21
Şekil 3.11. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin belirlenmesi.....	23
Şekil 5.2. <i>Artemia salina</i> yetiştirme ortamı.....	38
Şekil 5.3. 48 saat inkübasyon sonucu yumurtadan çıkan <i>Artemia salina</i> larvaları	38
Şekil 5.4. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi	43
Şekil 5.5. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU) in kimyasal yapıları.....	44
Şekil 5.6. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	46
Şekil 5.7. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	47
Şekil 5.8. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	47
Şekil 5.9. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	48

- Şekil 6.1. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD).....56
- Şekil 6.2. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimlerinin (KKD) konsantrasyona bağlı artışını gösteren eğim çizgisi56
- Şekil 6.3. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total kromozom aberasyonları (KA).....58
- Şekil 6.4. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total kromozom aberasyonlarının (KA) konsantrasyona bağlı artışını gösteren eğim çizgisi59
- Şekil 6.5. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe gözlenen total replikasyon indeksi (RI) değerleri61
- Şekil 6.6. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe gözlenen total replikasyon indeksinin (RI) konsantrasyona bağlı azalma gösteren eğim çizgisi.....61
- Şekil 6.7. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total mitotik indeks (MI) değerleri.....62
- Şekil 6.8. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total mitotik indeks (MI) değerlerinde konsantrasyona bağlı azalma gösteren eğim çizgisi..62
- Şekil 6.9. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen % MN değerleri.....64
- Şekil 6.10. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen % MN değerlerinde konsantrasyona bağlı azalma gösteren eğim çizgisi.....65

- Şekil 6.11. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD)..... 66
- Şekil 6.12. Kontrol grubuna ait insan periferal lenfositlerinde indüklenmiş KKD'ler (X1000)..... 67
- Şekil 6.13. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait insan periferal lenfositlerinde indüklenmiş KKD'ler (X1000)..... 68
- Şekil 6.14. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama KA değerleri 69
- Şekil 6.15. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait erken kromatid ayrılması (X1000)..... 70
- Şekil 6.16. PERC'e direk maruz kalmış (3mM) bireylere ait kromozom tipi kırılma (a) ve kardeş kromatid değişimi (b) (X1000) 71
- Şekil 6.17. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait poliploidi (X1000)..... 71
- Şekil 6.18. PERC'e direk maruz kalmış (3mM) bireylere ait kromatid tipi kırılma (X1000)..... 72
- Şekil 6.19. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama Replikasyon İndeksi (RI)... 74
- Şekil 6.20. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen Mitotik İndeks (MI) değerleri..... 74
- Şekil 6.21. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama MN (%) değeri..... 76
- Şekil 6.22. Kontrol grubuna ait binukleuslu hücre (X1000)..... 77
- Şekil 6.23. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait mikronukleus içeren binukleuslu hücre (X1000)..... 77
- Şekil 6.24. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait büyük mikronukleus içeren binukleuslu hücre (X1000)..... 78

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 6.1. Toksikite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerleri	53
Çizelge 6.2. Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i>) Lethality (BSL) Assay LD ₅₀ Limitleri	53
Çizelge 6.3. <i>Artemia salina</i> larvalarında gözlenen % ort. canlılık değeri.....	54
Çizelge 6.4. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD)	55
Çizelge 6.5. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total kromozom aberasyonları (KA)	58
Çizelge 6.6. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI) değerleri.....	60
Çizelge 6.7. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen % MN değerleri	64
Çizelge 6.8. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD).....	66
Çizelge 6.9. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama KA değerleri	69
Çizelge 6.10. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI) değerleri.....	73
Çizelge 6.11. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama MN (%) değeri	75

1. GİRİŞ

Günümüzde Avrupa’da çok yaygın olarak kullanılmakta olan kuru temizleme endüstrisi, Türkiye’de de hızla yaygınlaşmaktadır. Tekstil ürünlerinin üzerinde bulunan kir ve lekeleri çıkarma işlemlerinin tamamı, sulu yıkama ile yapılmaktadır. Ancak bazı tekstil ürünleri su ya da alkali olan deterjanlara karşı hassastır ve bu da ürünü koruma şartlarını sağlayamamaktadır. Bunun yanı sıra bazı yağ ve petrol bazlı lekeler de sulu yıkama ile çıkarılamamaktadır. Tekstil ürünlerini temizlemede amaç ürünlerde hasar oluşturulmaması, ömürlerinin kısaltılmaması, görünümünün ilk günkü yeniliğinde muhafaza edilmesi ve renklerinin değişmemesidir. Bu nedenle su ile yıkamaya alternatif olarak geliştirilen kuru temizleme ile tekstil ürünlerinin kirlere arındırılması, lekelerin çıkarılması ve sağlık açısından sorun oluşturabilecek etkenlerin ortadan kaldırılması hedeflenmektedir. Bu sebeplerden dolayı leke çıkarmada kuru temizlemenin önemi büyüktür.

Kuru temizleme, ürünlerin üzerinde bulunan kir ve lekeleri çıkarmak için solvent adı verilen özel bir kimyasal ilaç ile yapılan temizleme işlemidir. Temizleme sırasında kullanılan solventin hemen hemen hiç su içermemesinden dolayı bu işleme “kuru temizleme“ adı verilmektedir Kuru temizleme işlemi tekstil üreticilerinin imal ettikleri ürünleri ve ürün üzerinde bulunan tamamlayıcı aksesuarları kuru temizleme, ütüleme ve çekmezlik testi gibi bir takım işlemlere tabi tuttukten sonra ürünlere koydukları bakım talimatı doğrultusunda yapılır. Sık yapılan kuru temizleme, giysilere zamanla yerleşerek kumaş liflerine nüfus eden ve zımpara gibi aşındırıcı etkisi olan kirlere ve pisliği çıkararak giysilerin yeni alınmış gibi bir görünüme sahip olmasına yardımcı olmaktadır (Ataç, 2011).

Kuru temizlemenin tarihi antik zamanlara ve tekstil ürünlerinin kullanım başlangıcına kadar uzanmaktadır. İlk zamanlarda giysiler üzerindeki yağı çıkarmak için küllü su, amonyak ve bir çeşit killi çamur kullanılmıştır. Kuru temizlemenin orijini hakkında çeşitli görüşler olmasına rağmen hepsi bir nokta üzerinde birleşmektedir. İlk kez 19. yüzyılın sonlarında Paris’te kullanılmaya başlanan kuru temizleme teknolojisinin keşfi aslında bir rastlantıya dayanmaktadır. Petrol bazlı bir sıvının makine yağlı bir kumaş üzerine dökülmesi ve buharlaşmasından sonra lekenin ortadan kaybolması, kuru temizlemenin doğuşu hakkında hemen herkesin üzerinde birleştiği tek noktadır. İlk kuru temizleme mağazası 1840 yılında Jolly Belin tarafından Paris’te açılmıştır.

İlk zamanlarda kuru temizleme solventi olarak şampanya, benzin ve gaz yağı içeren sıvılar kullanılmıştır. Bu sıvıların tamamı çabuk tutuşabilen tehlikeli sıvılar olduğundan birçok yangının çıkmasına neden olmuştur. Daha güvenli kuru temizleme sıvıları bulunana kadar kuru temizlemecilik riskli ve tehlikeli bir iş olarak yapılmıştır. Daha sonraları bu sıvıların yerini kerosen benzeri etilen ve son olarak da 1930'ların ortalarında perkloretilen (PERC) denen ve kolay tutuşmayan sentetik bir sıvı almıştır.

PERC, ilk olarak 1821 yılında "Michael Faraday" tarafından "heksakloretilen" in ısıtılmasıyla sentezlenmiştir. Perkloretilen kimyasal formülü C_2Cl_4 olan ve genellikle kuru temizleme solventi olarak kullanılan kimyasal bileşiktir. PERC, etilenden '1,2 dikloretilen' denilen kimyasal aracılığı ile üretilmektedir. "1,2 dikloretilen" 400 °C de klor ile ısıtılarak muamele edildiğinde kimyasal reaksiyon sonucunda perkloretilen ortaya çıkmaktadır. Trikloretilen bu reaksiyon esnasında açığa çıkan diğer bir yan ürün olduğundan, bu iki kimyasal daha sonra distilasyon tekniğiyle birbirinden ayrılmaktadır (Ataç, 2011). Kuru temizlemede kullanılan perkloroetilen, hidrofilik (su emerek şişen, kısalan kumaşlar) özelliğe sahip tekstil liflerini bozmaz. Kumaş liflerinin temizleme sırasında aldıkları bu kimyasal madde, kurutma esnasında uçar. Çünkü perkloroetilen, 70 °C buharlaşarak, kumaşı bozmadan, kumaş üzerinde ve bünyesinde su gibi nemlilik bırakmadan, suda olduğu gibi kumaşı şişirip, kısaltmadan ve çektirmeden kumaşı kendi normal boyutunda bırakarak, kolayca buharlaşmaktadır. PERC, buharlaştığında keskin, tatlı sert bir koku çıkartmaktadır (Anonim, 2003). Perkloretilen kimyasal uçucu bir madde olduğundan makine ve buhar yardımı ile kumaş üzerinden kısa sürede ayrılmaktadır. Bu yüzden birçok gelişmiş ülkede kuru temizleme yerine "Kimyasal Temizleme" deyimini kullanılmaktadır.

Avrupa'da kuru temizleme endüstrisinde çalışan yaklaşık 1,5 milyonun üzerindeki kuru temizleme işçisi her yıl ortalama olarak 59 ppm ve uygulamaya bağlı olarak daha yüksek düzeyde PERC'e maruz kalmaktadır. Kuru temizleme merkezlerinde kullanılan PERC veya TCE (Tetrakloroetilen), deney hayvanları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda "kanserojen" etkisi ispatlanmış, insanlarda 2A sınıfında (olası kanserojen) olarak nitelendirilen kimyasal bir maddedir. Türkiye'de ise kuru temizlemede çalışan işçi sayısı ve maruz kalınan PERC miktarı kesin olarak bilinmediği için, ülkemizdeki işçilerin durumu hakkında kesin bir şey söylemek mümkün değildir.

Her kimyasal madde, kullanılan doza bağılı olarak değişik hücre, doku ve organlar üzerinde toksisiteye neden olabilmektedir. Bir kimyasalın toksisite profili, deney hayvanlarında yapılan toksisite testleri sonucunda ortaya çıkarılmaktadır. Zehirlenme etkenleri organizmaya çeşitli yollar ile girmektedir. Bu yollar, inhalasyon (gaz, buhar ya da uçucu özellikte maddelerin, sıvı yapılı maddelerin ya da çok ince bir toz haline getirilerek çözündürülmüş katı yapılı maddelerin tedavi için solunum yollar aracılığıyla vücuda verilmesi), oral (ağız yolu ile), ven (damar yoluyla), subkutan (dermis tabakası altındaki gevşek bağ dokusu (adipoz doku) içine ilaç verilme yöntemi) şeklindedir. Kimyasallara maruziyet sonucunda organizmaya giren zehirlenme etkeni absorplanarak kan dolaşımına geçer, kan dolaşımı ile hedef organa gider, biyotransformasyon reaksiyonlarına uğrayarak, atılır. Doza bağılı olarak belirli bir süre kimyasallara maruziyet sonucunda, hedef organda birikme söz konusu olabilmektedir (Burgaz, 1994).

Vücuda başlıca solunum, ağız ve deri yolu ile giren ve kanserojen özellik taşıyabilen PERC, canlılarda pek çok sağlık sorununa neden olmaktadır. PERC'in fazla miktarda ani solunması sinir sistemini etkileyebilmekte, sersemlik hissine, uyku haline, yürüme ve konuşmada güçlüklerle, baygınlıklara, bilinç kaybına, koma haline ve hatta ölümlere neden olabilmektedir. Bu madde aynı zamanda solunum yollarında ciddi tahriş ve kimyasal tahrişe bağılı zatürreye, kronik öksürüğe ve diğer solunum yolu hastalıklarına da yol açabilmektedir. PERC, kapalı ve yetersiz havalandırılmış mekanlar da buharlaştığı zaman mevcut oksijen durumuna göre bayılmaya ve ölüme sebep olabilmektedir. 200 ppm PERC, baş dönmesine neden olurken, doz yükseldikçe solunum yolu tahrişlerine, bulantıya, bilinçsizleşmeye, sarhoşluğa yol açmaktadır. 1000 ppm' in üzerindeki dozlar ise, bayılma ve ölüme neden olurken, 6000 ppm'in üzerinde birkaç dakika süreli PERC'nin solunması, anlık ölümlere yol açabilmektedir (Anonim, 2009).

PERC'nin ciltle uzun süre temas sonrasında ise ciltte yaygın tahriş, düzelmeyen alerjik rahatsızlıklar görülebilmektedir. Böbrekler ve karaciğerde harabiyet ise diğer hasarlar arasında sayılabilir. PERC ile ilgili yapılan yeni çalışmalar, bu maddeye maruz kalan hamilelerde nedensiz düşüklere daha sık gözlendiğini ve hem kadınlarda hem de erkeklerde doğurganlık oranının düştüğünü bildirmektedir. Kronik maruziyet sonrası değişen genetik yapı nedeniyle PERC ile temas eden bireylerin çocukları ve sonraki nesiller de hiç karşılaşmadıkları bu madde nedeniyle zarar görme riski ile karşı karşıya kalmaktadır (Fişek ve Piyal, 1989; Karakaya, 1996).

Tavsiye edilen prosedürlere uyulduğu ve uygun bir şekilde saklanıp kullanıldığı takdirde, PERC belirgin bir kanserojen risk taşınmadığına dair bilgiler sınırlıdır ve şimdiye kadar perkloretilene maruz kalma ile kanser arasında kesin bir bağ kurulamamıştır. Yapılan çalışmalarda PERC'nin farelerde tümör oluşumunu arttırdığı görülürken (Green vd., 1990) diğer bazı araştırmalarda uzun süreli solunum testleri sonucunda farelerde tümör oluşturuca reaksiyon görülmemiştir.

Uluslararası Kanser Araştırma Enstitüsü (IARC)'nin 1995 yılında yaptığı çalışmaya göre kuru temizleme işleminde kullanılan PERC ve TCE'e uzun süre maruz kalma sonucunda, başlıca yemek borusu, rahim ağzı, rahim, mesane kanserleri ile Non-Hodgkin Lenfoma (lenf bezi kanseri) gibi kanser türleri ortaya çıkarmaktadır. Bu merkezlerde çalışan kişilerde özellikle mesane ve rahim ağzında görülen kanser riskinin normal kişilere göre yaklaşık yüzde 45 oranında arttığı bulunmamaktadır. Bu maddelerin mide ve pankreas kanserine zemin hazırladığı düşünülse de bu konuda henüz yeterince bilimsel kanıt saptanmamıştır. Ancak kuru temizleme sektöründe çalışan kişilerin kanser ve benzeri hastalıklar yönünden risk altında buldukları da bir gerçektir (IARC, 1995).

2. KONU VE AMAÇ

Günümüzde gelişen dünyada her geçen gün kimyasal madde miktarı ve kullanımı artmaktadır. Kimyasal maddelerin insanda neden olduğu mutasyon riskini kantitatif olarak değerlendirmek çok güçtür. İnsanların mutajenlere maruz kalması ile etkilerinin görülmesi arasında uzun bir süre vardır. İş ortamında sağlıksız koşullarda, kimyasal maddelere belli bir süre maruziyet sonucunda istenmeyen sağlık durumları (meslek hastalıkları) ortaya çıkmaktadır. Meslek hastalıkları ya da istenmeyen sağlık durumları koruyucu önlemlerin alınması ile önlenebilir durumlardır. Bunun için de yasalar ile belirlenmiş olan tehlikeli kimyasal maddeler ile çalışma kurallarına tamamen uyulması ayrıca, bunun etkin bir şekilde denetlenmesi ve PERC'e maruz kalan insanlar üzerinde toksik etki göstereceğinin kuru temizleme çalışanları tarafından bilinmesi gerekmektedir.

Amerika'da 1992 yılından beri Çevre Koruma Ajansı EPA tarafından, PERC'nin kullanımını azaltmak için araştırmalar yapılmaktadır. Kuru temizleme gerektiren kumaş ve lekelerin çoğuna hitap eden yeni ve farklı yıkama teknikleri

geliştirilmektedir (U.S. EPA, 1991). Ülkemizde ise halen PERC'nin kullanılmasına dair hiçbir kısıtlama ve kontrol bulunmamaktadır.

Avrupa'da kuru temizleme endüstrisinde çalışan yaklaşık 1,5 milyonun üzerindeki işçi her yıl ortalama olarak 59 ppm ve uygulamaya bağlı olarak daha yüksek düzeyde PERC'e maruz kalmaktadırlar. Türkiye'de ise kuru temizlemede çalışan işçi sayısı ve maruz kalınan PERC miktarı kesin olarak bilinmediği için, ülkemizdeki işçilerin durumu hakkında kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Perloroetilen'in (PERC) genotoksik aktivitesi bakteri, maya ve memeli hücreleri gibi in vitro assay sistemlerinde geniş bir şekilde çalışılmıştır (U.S. EPA, 1985, 1991; IARC, 1995; ATSDR, 1997). PERC'in, in vitro muameleyi takiben farklı hücrelerde mikronukleus ve kardeş kromatid değişimine (SCEs), tümör dokularında DNA'ya ve SSBs (single-strand breaks)'ye bağlanma gibi bazı genotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Walles (1986), farelere intraperitoneal (i.p) yolla 4–8 mmol/kg (663–1326 mg/kg) PERC uyguladıktan 1 saat sonra, farelerin karaciğer ve böbrek dokularında artan oranlarda tek iplikli DNA zincir kırıklarının olduğunu ancak akciğer dokularında bu tür bir hasara rastlanmadığını bildirmiştir. Potter ve arkadaşları (1996) erkek F344 sıçanları 1.000 mg/kg perloroetileni tek bir gavaj (sonda) ile muamele ettikten sonra, farelerin böbreklerindeki DNA zinciri kırılmalarında herhangi bir artış olmadığını bulmuşlardır. Ancak, türler veya maruz kalınan dozlar arasındaki bu farklılıkları doğrudan karşılaştıracak çalışmalar bulunmamaktadır. Muzzullo ve arkadaşları (1987), PERC'in fare karaciğer ve sıçan böbreğinde DNA'ya bağlandığını bulmuştur. 5 mM (~830 mg/L) tetrakloroetilenin insan kan kültürlerinde, kardeş kromatid değişimlerine (SCE) neden olduğu ve hücre canlılığını % 40 oranında azalttığı (Hartmann ve Speit, 1995), PERC'in kültüre edilen Chinese hamster karaciğer hücrelerinde (Wang vd., 2001) ve insan periferik kan hücrelerinde mikronukleuslara neden olduğu rapor edilmiştir (Doherty vd., 1996; White vd., 2001). PERC ile muamele edilen insan lenfoblastosid hücrelerinde gözlenen mikronukleus oluşumunun, cDNAYı kodlayan ya CYP2E1 (hE1 hücreleri) ya da insan CYP1A2, 2A6, 3A4, 2E1 ve mikrozomal epoksid hidrolazın stabil ekspresyonu nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği belirtilmiştir (Doherty vd., 1996). Bu bulguların aksine, in vitro olarak PERC'e maruz bırakılan Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde SCE veya kromozom hasarlarına rastlanılmamıştır (Galloway vd., 1987). PERC ile yapılan in vitro mutasyon denemeleri (Ames test) veya DNA bağlanma denemeleri sonuçları, GSH (glutatyon) metabolitlerinin

üretildiği koşulların birkaçı hariç büyük ölçüde negatif olmuştur. PERC'in yüksek dozlarına (maruz kalma seviyesi belirlenmemiştir) akut olarak maruz kalma sonucunda hepatomegali, karaciğer hücrelerinde hasarlar, birkaç karaciğer enziminde yükselme, bilirubin parçalanması gibi hepatotoksik etkilerin de ortaya çıktığı gözlenmiştir (Coler ve Rossmiller, 1953; Stewart vd., 1961; Meckler ve Phelps, 1966; Saland, 1967; Hake ve Stewart, 1977; ATSDR, 1997). Kesitsel bir çalışmada kuru temizleme çalışanları arasındaki karaciğer hasarlarının sıklığı incelenmiştir (Lauwerys vd., 1983; Cai vd., 1991; Gennari vd., 1992; Brodtkin vd., 1995). Bu çalışmalar sonucunda karaciğerde sonografik değişikliklerin ve serumda bulunan ve karaciğer hasarına neden olan karaciğer enzim değişikliklerinin olduğunu ortaya koymuştur.

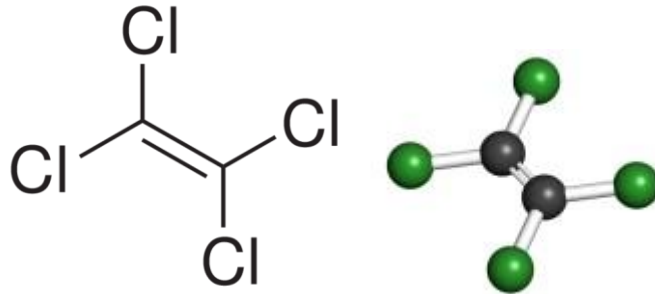
Bu bilgiler ışığında bu tezde; Aydın bölgesinde kuru temizleme dükkanlarında çalışan bireylerin maruz kaldıkları kimyasal ve çözücü madde olarak kullanılan PERC'in potansiyel sitotoksik etkisi *Artemia salina* (Brine shrimp) Letality Assay yöntemi ile potansiyel in vitro genotoksik etkisi de periferik kan lenfosit hücrelerinde kromozom aberasyon testi (KA), kardeş kromatid değişimi testi (KKD) ve mikronukleus testi (MN) ile araştırılmış ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda, perkloroetilenin kuru temizleme çalışanları üzerindeki olası zararlarının ortaya konması amaçlanmıştır.

3. GENEL BİLGİ

3.1. Perkloretilen (PERC)

3.1.1. Genel Özellikleri

Perkloretilen (1,1,2,2-tetrakloroetilen, tetrakloreten, perkloretilen, PERC, C_2Cl_4 , $Cl_2C=CCl_2$), yanıcı olmayan fakat uçucu bir solventtir (Şekil 3.1). Havada 1 ppm kadarlık bir miktarının bile insanlar tarafından fark edebilecek kadar keskin bir kokusu vardır. Perkloretilen, dikloreterandan üretilmektedir. Trikloretilen bu reaksiyon esnasında açığa çıkan diğer bir yan ürün olduğundan, bu iki kimyasal daha sonra distilasyon tekniğiyle birbirinden ayrılır. Diğer bütün klorlu solventler gibi perkloretilenin de sinir sistemi üzerinde depresan etkisi vardır. Buharıyla temas, baş dönmesi, baş ağrısı, uyku hali, bilinç kaybı yaratabilirken, devamlı olarak insan derisiyle temasta perkloretilen derideki yağı tümüyle çözeceğinden ciddi deri problemlerine neden olabilir.



Şekil 3.1. PERC'in kimyasal yapısı

3.1.2. Kullanım Alanları

Perkloretilen, kuru temizleme başta olmak üzere birçok uygulamada yaygın olarak kullanılan bir solventtir. Suda çözünürlüğü sınırlıdır ancak etanol, aseton, kloroform gibi çözücülerle tümüyle karışabilir. Birçok organik madde de perkloretilen içinde çözünür.

Perkloroetilen kuru temizlemenin yanı sıra otomotiv ve diğer metalle ilgili sektörlerde metal üzerindeki yağları almak amacıyla kullanılır. Tiriz ve leke

giderici gibi tüketici ürünlerinin içinde bileşen olarak yer alır. Diğer bir kullanım alanı ise hidrokloroflorokarbonlu (HCFC) soğutucuların üretimidir.

3.2. *Artemia Salina* (Brine shrimp)

3.2.1. Organizmanın Özellikleri

Artemia salina Crustacea alt şubesi, Branchiopoda sınıfı, Anostraca takımına bağlı primitif kabuklular arasında yer alan, doğada tropik ve ılıman bölgelerde 500'ün üzerinde doğal ve yapay tuz gölünde yaşayan bir kabuklu türüdür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Artemia salina* genel görünümü
(<http://wanhefeed.com/?p=1#!prettyPhoto>, 04.07.2013)

Ergin bireyleri %1 ile %235 tuzluluk ve 10-35 °C sıcaklık aralıklarında yaşayabilir. Böylesine geniş bir yaşam aralığına sahip olan bu zooplankton su canlılarının üretilmesinde larva besleme aşamasında çok önemli bir yer almaktadır. *Artemia salina* su canlılarının, özellikle de balıkların kültür çalışmalarında 1920'den bu yana canlı yem olarak kullanılmaktadır. *Artemia*'nın yaşam devri boyunca dayanıklı yumurtalar (kistler) oluşturması, balık kültüründe kullanılmasındaki en önemli özelliktir (Anonim, 2008).

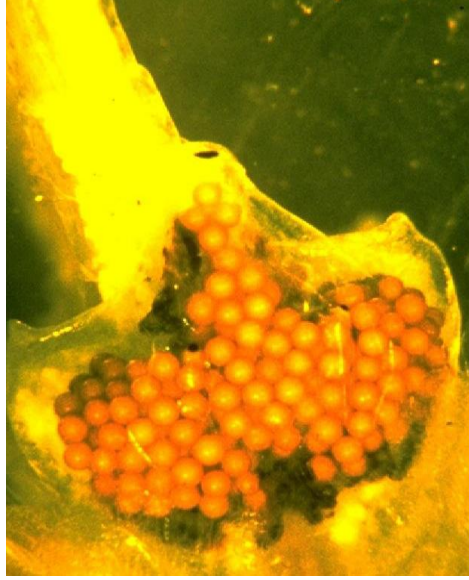
Dünya genelinde 4000 ton civarında kuru *Artemia* yumurtası (kisti) 0.4 mm *Artemia salina* larvası (nauplii) üretiminde kullanılır. Olumsuz koşullarda neslin devamı amacıyla oluşturulan kist son derece güvenilir, uygun ve mükemmel bir canlı yem kaynağı oluşturur. Bu kistler yıl boyunca aşırı tuzlu göllerin veya lagünlerin kıyılarından toplanabilir. Toplanan kistler yıkanıp temizlenip kurutularak paketlenir ve tüm dünyaya dağıtılır. Kistler deniz suyuna konulduğunda 24 saat içinde *Artemia salina* larvaları (nauplii) çıkar ve kullanılabilir hale gelir (Anonim, 2008).

Artemia salina vitamin, yağ asitleri ve renk maddeleri (pigmentler) bakımından oldukça zengindir (Üren, 2011). *Artemia*'lar besin değeri ve kalitesi nedeniyle akvaryum balıkları, tatlısu balıkları ve deniz balıkları üretiminin larva besleme ve büyütme aşamasında en yoğun olarak kullanılan canlı yemdir (Anonim, 2008). Daha önceki yıllarda sazan ve akvaryum balıklarının beslenmesinde kullanılan *Artemia* son yıllarda deniz balıkları ve karides yetiştiriciliğinde de ikinci canlı yem olarak kullanılmaktadır. Deniz suyunda 24 saatlik inkübasyondan sonra, bu yumurtalardan çıkan larvalar (nauplii), çeşitli deniz ve tatlı su organizmaları için doğrudan besleyici bir canlı yem olarak verilebilir. Bunun nedeni çeşitli büyüklüklerdeki çok sayıda balık türünün ağız açıklıklarına uygun olmaları (350-400 mikron), vücutlarını çevreleyen dış kabuğun sindirim salgılarınca kolayca sindirilebilir olması ve besin içeriğinin özellikle protein yönünden çok zengin olmasıdır.

2008'de dünya genelinde *Artemia salina* nauplii'nin en fazla üretildiği göllerden birisi ABD'deki "Büyük Tuz Gölü" (Great Salt Lake) ve San Francisco Körfezi'dir. Bunu dışında Çin, İran gibi ülkelerde belli oranlarda üretim yapılabilmektedir. Ülkemizde ise İzmir Çamaltı Tuzlasında az da olsa *Artemia salina* yumurtası elde edilmektedir. Bugün dünyada sadece *Artemia*'lar ile ilgili araştırma yapan enstitüler bulunmaktadır (Üren, 2011).

3.2.2. *Artemia* Yumurta Yapısı

Dişi bireylerin bıraktığı kış yumurtaları suyunu kaybetmediği için, küreseldir. Olağanüstü koşullarda (çok yüksek tuzluluk ve çok düşük oksijen seviyesi vb) embriyo sadece gastrula evresine kadar gelişir ve etrafı yumurta kesesi etrafında bulunan bir bez tarafından salgılanan kalın bir kabukla çevrilir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Henüz olgunlaşmamış Artemia yumurtası (Anonim, 2008)

Artemia kistleri yılın belli zamanlarında doğal ortamında su yüzeyinde yüzerken rüzgar ve dalgalar tarafından kıyıya atılır. Bu kistler metabolik olarak aktif değildir ve gelişimlerine izin vermeden toplanıp kurutulurlar. Deniz suyuna karıştırıldıktan sonra, bikonkav şeklindeki kistler su alarak küreselleşir ve kabuk içindeki embriyo metabolizması kesintiye uğramadan devam eder (Şekil 3.4). Bu yumurtalar yüksek tuzluluktaki sulara bırakıldığında su kaybeder ve büzüşürler. Su üzerinde yüzen bu kistler, kahverengi kitleler halinde suyun durgun bölgelerinde birikirler. Uygun yöntemlerle toplanan yumurtalar (kistler) yıkanıp kurutularak tekrar kullanıma hazır hale getirilirler. Yıkama ve kurutma esnasında uygulanan yöntemler yumurtanın açılma kalitesini belirler. Çünkü bu işlemler sırasında çok sayıda yumurta çatlayıp, ölmektedir. Bu nedenle yumurtaların işlenmesinde en üst düzeyde titizlik gerekmektedir. Uygun şartlarda yıkanan ve kurutulan yumurtaların ömrü, havası alınmış ambalajlarda 15 yıla kadar ulaşabilmektedir (Şekil 3.5) (Anonim, 2008).



Şekil 3.4. Dış ortama atılmış *Artemia salina* yumurtası (Anonim, 2008)

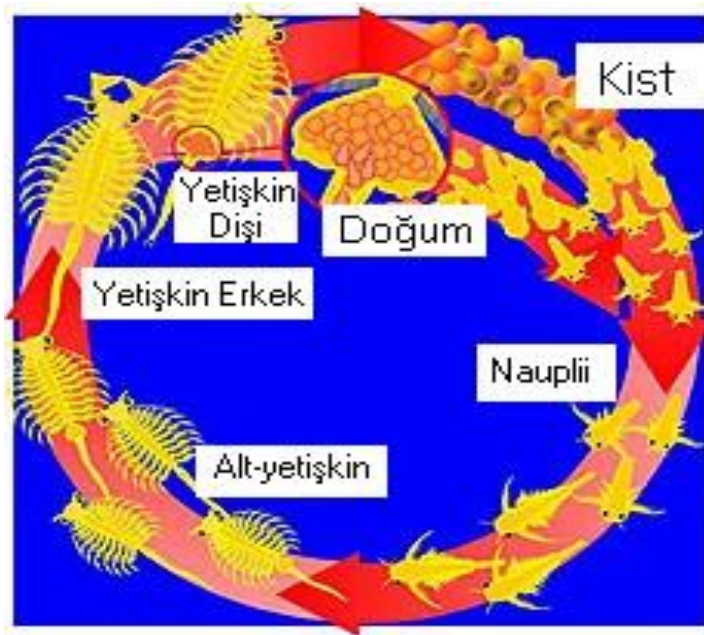


Şekil 3.5. Ticari olarak satılan *Artemia salina* yumurtaları

Kuluçkalamadan yaklaşık 20 saat sonra, kist patlar ve embriyo görünür. Embriyo boş bir kabuk altında asılıyken (şemsiye aşaması) nauplii gelişimi tamamlanır ve kısa bir süre içerisinde serbest yüzen nauplii'ler ortaya çıkar (Şekil 3.6, Şekil 3.7) (Üren, 2011).



Şekil 3.6. *Artemia salina* yumurtaları ve yumurtadan çıkıp serbest yüzen nauplii'ler (<http://wanhefeed.com/?p=1#!prettyPhoto>, 04.07.2013)



Şekil 3.7. *Artemia salina* yaşam döngüsü (Treece, 2000)

3.2.3. Brine-shrimp (*Artemia salina*) Lethality (BSL) Assay

Bilinen bütün kimyasalların yan etkileri, aslında toksik etkileridir. Kimyasallar belirli bir dozdan sonra öldürücü etki gösterebilirler. Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Bazı araştırmacılar akut toksisiteyi, tek ya da birkaç dozun 48 saat içinde deney hayvanlarında veya kaza sonucu insanlarda oluşturduğu etki olarak tanımlamaktadırlar. Akut toksisite saptanmasında başvuru deneylerinin amacı biyolojik sistemlerde kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek ve doz-yanıt ilişkisinde karakteristik veriler elde etmektir. Bu veriler, yeni ilaçların kliniğe uygulanmasındaki olabilirlik derecesini ortaya koymaktadır.

Toksikolojide akut toksisite deneyleri; ilaç, kozmetik, hijyenik maddeler ve evlerde çeşitli amaçla kullanılan diğer kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek için yapılır. En sık kullanılan akut toksisite testleri;

- Minimal Mortal Doz (MMD)
- Letal Doz 50 (LD50) 'dir.

1926 yılında Knaffl-Lenz tarafından kobaylarda dijitalis'in toksik aktivitesinin gösterilmesinde tarif edilen Minimal Mortal Doz (MMD), damar içi yolla sürekli ve yavaş akımla bir ilacın hayvanın ölmesine kadar verilmesiyle elde edilir. Tavşan, kedi, köpek gibi hayvanlarda kolay uygulanabilir ve fizyolojik parametrelerdeki değişiklikler izlenebilir. Ancak çok sayıda hayvana uygulanmasının biyoistatistik zorunluluğu yanında, damar içi verilmesi nedeniyle kimyasal maddenin inert bir solvent içinde erimesi ve etkisini çabuk göstermesi gerekmektedir. Hayvana enjekte edilen total sıvı hacmi, dolaşım kapasitesini geçmemelidir. Bu nedenlerden ötürü MMD fazla kullanılan bir akut toksisite yöntemi değildir.

Bazı araştırmacıların 'medyan letal' doz diye adlandırıldığı Letal Doz₅₀ (LD₅₀) bir deney hayvan grubunun % 50'sini öldürebilen bir kimyasal maddenin tek bir dozunun istatistiki değerlendirmesidir. Bir maddenin akut toksisitesinin değerlendirilmesinde LD₅₀ tayini sıklıkla başvuru bir toksikoloji değerlendirme yöntemidir (Dökmeci, 1994).

Brine-shrimp (*Artemia salina*) Lethality (BSL) Assay, LD₅₀ düzeyinin tespitinde kullanılan toksisite testlerindedir (Harwig ve Scott, 1971). *Artemia salina* larvaları, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksisitelevlerinin tayininde, oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır ve toksik maddelerin in-vivo olarak *Artemia salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak "Brine-Shrimp Lethality Assay"ın kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Choudhary ve Thomsen, 2001).

BSL, toksisitenin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. Ayrıca fungal toksinlerin, bitkisel ekstraktların, ağır metallerin, cyanobacteria toksinlerinin, pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin, sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır (Harwig ve Scott, 1971; Solis vd., 1993; Uğur vd., 2000). Bunlara ek olarak, embriyonel gelişim sürecini etkileyen teratojen maddelerin (Sleet ve Brendel, 1983), organofosfor insektisitlerin (Sanchez-fortun vd., 1996), ve zirai amaca yönelik olarak oldukça sık kullanılan birçok antibiyotığın, toksisite düzeylerinin tespitinde de kullanılmaktadır (Migliore vd., 1997).

Artemia salina'nın kullanıldığı bazı akuatik toksisite testleri ile, rodentlerin (fare veya rat) kullanıldığı toksisite testleri arasında bir korelasyon olup olmadığını anlamak üzere bazı çalışmalar yapılmış ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Her iki testten elde edilen LD₅₀ değerleri, aynı kimyasalların insanlar için geçerli olan akut oral letalite verileriyle kıyaslandığında, sonuçlar arasında genellikle iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak, bu kimyasalların, oral akut toksisite potansiyellerinin test edilip, insanlar için geçerli olan akut dozlarla kıyaslandığında; akuatik testlerin, rodent testlerine nispeten biraz daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Ancak akuatik toksisite testlerinin, suda çözünebilir maddelerin toksisite değerlerinin saptanmasında daha uygun olduğu belirtilmiştir (Calleja ve Persoone, 1992; Logarto vd., 2001). Yine, *Artemia salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre 21 kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir (Lewan vd., 1992).

3.2.5. Kromozom Aberasyonu (KA) Testi

Periferik kan lenfositleri mitotik interfazın aynı G_0 veya G_1 basamağında aynı anda olmuş hücre popülasyonlarıdır. Sağlıklı bireylerde, bu hücreler sadece seyrek olarak in vivo mitotik çoğalmada bulunurlar. Kültüre edilmeleri kolaydır ve sonuç olarak bunlar kromozom aberasyonunun hesaplanması için ayrı hücrelerin hazır kaynaklar olarak kullanılabilirler. Lenfositler aynı anda kültüre edilmiş popülasyonlar olsa da, aynı bireyler farklı alt popülasyona sahip hücrelerde farklı hücrelerin alt popülasyonu bulunur. Ancak, ayrıcalıklı büyümenin homojen olmama ihtimali vardır (Erol, 2010).

Kültüre alınmış periferik lenfositlerdeki kromozom anormallikleri incelenmektedir. Oldukça yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. Kromozomal anormallik tekniği kullanılarak elde edilen yapısal değişimler, mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilir (Çakmak, 2000). Kromozom anormalliklerinin oluşum mekanizmasının farklı dokularda benzer olmasından dolayı lenfositlerdeki anormallik seviyesinin kansere eğilimli dokulardaki anormallik seviyesini gösterdiği ve böylece kanser riskinin de göstergesi olduğu düşünülmektedir (Albertini vd., 2000; Bonassi vd., 2004; Bonassi vd., 2005). İnsan popülasyonları üzerine yapılan çalışmalar, periferik lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı (pozitif korelasyon) olduğunu ortaya koymaktadır (Natarajan, 2002; Yüzbaşıoğlu vd., 2006; Yılmaz vd., 2008). Bu yöntemle incelenebilen yapısal aberasyonlar; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerin birleşmesi (sister union), translokasyon, izokromozom ve endoreduplikasyondur (Hagmar vd., 1994; Bonassi vd., 1995).

Kromatid kırıkları, bir kromozoma ait iki kromatitten bir tanesinin kırık olması durumudur. Kromozom kırıkları ise her iki kromatitte birden kırıkların olmasıdır. İki kromozomun uçlarındaki kırılma ve sonra bu iki kromozomun kırılan uçlarının birleşmesiyle de disentrik kromozomlar oluşmaktadır. Bir kromozomun her iki kromatidinin uçlarındaki kırılma sonrasında, bu kromatidlerin birleşmesi ile de kardeş kromatidlerde birleşme denilen kromozomal anormallikler oluşmaktadır. Fragmentler ise kromozomlardan kopan parçaların kromozomdan ayrı bir yerde bulunması durumudur (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995).

3.2.6. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi

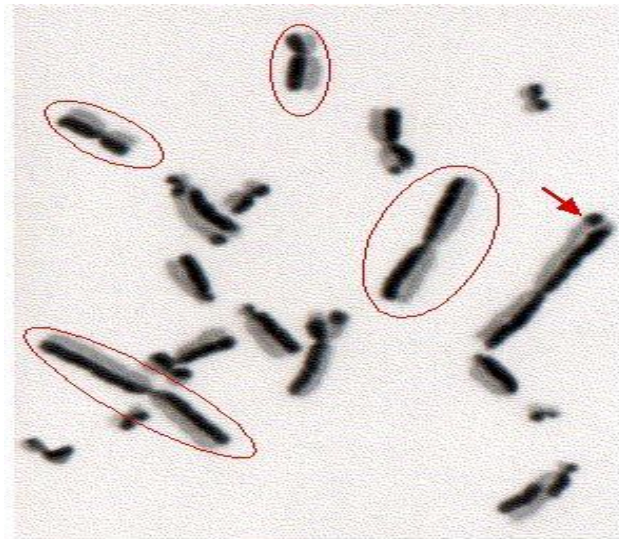
Potansiyel mutajenlere ve karsinojenlere maruz kalan insan populasyonlarının genetik biyozlemi, farklı genetik işaretleyiciler kullanarak yapılabilmektedir. Kardeş kromatid değişimleri (Sister chromatid exchange = SCE; KKD), DNA hasarına neden olan ajanların erken biyolojik etkilerinin belirlenmesinde en yaygın kullanılan sitogenetik işaretleyiciler arasında yer alır. KKD, mitozda ya da mayozda kardeş kromatidler arasında meydana gelen krosing-over benzeri bir olayla DNA replikasyonu sırasında kardeş kromatidlerin karşılıklı olarak yer değiştirmesidir. KKD hücre bölünmesinin normal bir özelliği olarak meydana gelebilmekle birlikte, kromozom morfolojisinde değişikliğe neden olmamaktadır. Hücre DNA'sı genotoksik ajanlar tarafından zarar gördüğünde oranı artmaktadır (Altıntaş vd., 2005).

Kardeş kromatidlerin değişimi ilk olarak J.Herbert Taylor tarafından ortaya konmuştur ve bu metod da kardeş kromatitler farklı radyoaktif moleküller ile işaretlenmişlerdir ve daha sonra kardeş kromatit değişimi otoradyografi (bir çeşit gösterim ya da ortaya koyma metodu) metodu ile ispatlanmıştır. KKD' nin güçlü bir ispatı ise DNA' nın polariteli ve çift sarmallı olmasıdır. İso kromatit işaretleme denilen bu metod kardeş kromatitlerin homolog kısımları arasında yapılır (Latt vd.,1977).

KKD, bir bütün DNA çiftinin değişimini takiben her iki DNA zincirinin kırılmasını içerir. Bu durum S fazı süresince meydana gelir. KKD, rekombinasyonel onarma, nokta mutasyonlarının oluşumu, gen çoğalması ve sitotoksisite ile karşılıklı ilişki içindedir. KKD, replikasyon esnasında kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA'nın resiprokal translokasyonu olarak bilinmektedir ve spontan olarak sağlıklı hücrelerinde, belirli sıklıklarda olmaktadır. DNA hasarına yol açan antineoplastik ilaçlar, kimyasal karsinojenler, mutajenler gibi birçok kimyasal ve fiziksel ajanlar, hatta sigara içmenin KKD sıklığına etkisi olduğuna inanılmaktadır. Bazı kronik hastalıklarda, viral ve bakteriyel enfeksiyonlarda da KKD oranı artabilmektedir. İmmun sistem uyarılarına cevap kapasitesi genetik olarak belirlendiğinden; KKD analizi, genomik düzensizlik ve muhtemel DNA hasarını belirlemek için hassas bir yöntemdir (Kaya ve Akyol, 2000).

Kardeş kromatidler çiftler oluşturur. Kardeş kromatidler eşleştğinde parça değişimi gerçekleşir. Eğer değişim gerçekleştiyse, kromatid parça parça açık ve koyu renklerde görülür (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991). KKD bazı maddelerin DNA'ya kovalent olarak bağlanması sonucu veya DNA tamir mekanizmasına müdahale edilmesiyle indüklenmektedir. Kardeş kromatid değişimleri DNA sarmalındaki değişiklikler ile oluşan kromatidlerde DNA'nın kırılmasına neden olmaktadır. KKD analizinin, herhangi bir genotoksik ajanın etkisinde kalma ile oluşabilecek genotoksitenin ölçülmesinde diğer sitogenetik analizlerden daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Akça vd., 2007).

Kardeş Kromatid değişim testi genellikle insan periferik lenfositlerine uygulanır. G_0 fazındaki hücreler, fitohemaglutinin ile bölünmeye teşvik edilir. İkinci mitozun metafazında hücreleri durdurmak ve mitotik hücre toplamak için, iğ ipliklerini inhibe eden kolsemid 72. saatte ilave edilir. İki hücre döngüsü boyunca kromatidleri ayırma fırsatı veren BrdU (bromo-deoxy-uridine) kültür ortamına eklenir. Sadece bir zincirdeki DNA BrdU almışsa normal karanlık Giemsa boyaması olur, diğer zincir daha açık renkle boyanır. Eğer değişim gerçekleştiyse, kromatid parça parça açık ve koyu renklerde görülür bunlara da "harlequin kromozomları" denir (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) (Şekil 3.8).



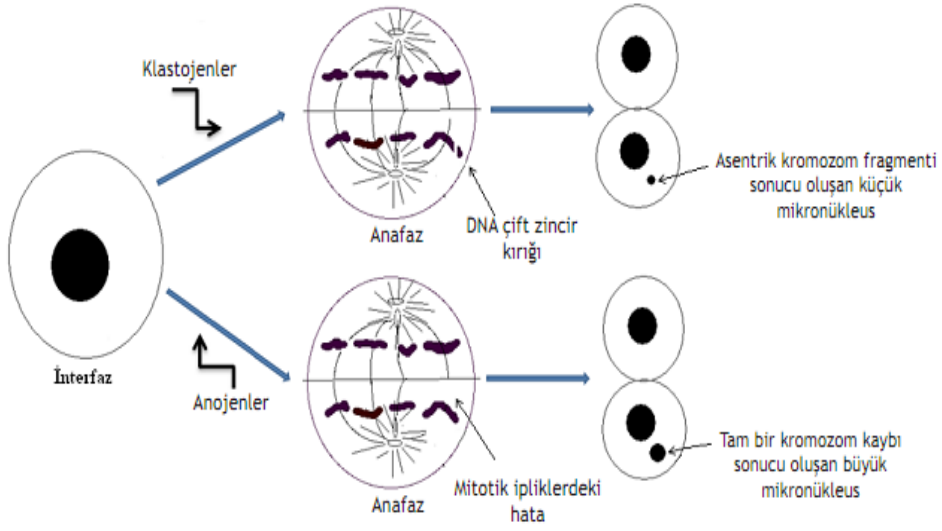
Şekil 3.8. Harlequin Kromozomları

(<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/H/Harlequin.html>, 04.07.2013)

3.2.7. Genotoksik Hasarın Belirlenmesinde Mikronukleus (MN) Testi

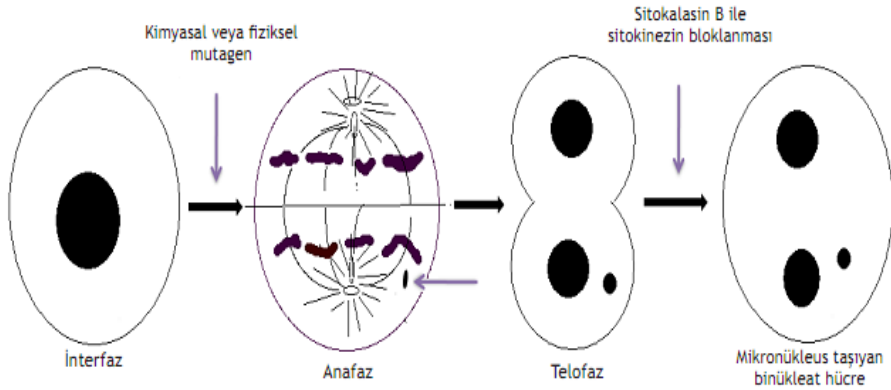
Radyasyona ve karsinojenik kimyasallara maruz kalındığı zaman kromozomlarda hasarların oluşması, fiziksel ve kimyasal ajanların ökaryotik hücrelerin genetik materyalinde büyük değişikliklere neden olduğunu gösterir (Evans, 1977). Kromozom anormallikleri DNA seviyesindeki hasarların belirtisidir, örneğin kromozom kırılmaları, DNA'daki çift iplik yapının tekrar tamir edilememesinden meydana gelebilir (Elhajouji vd., 1995). Kromozom kaybı ve kromozomların hatalı ayrılışı (non-disjunction), kanserde ve yaşlanmada çok önemli olaylardır ve metafazdan önce iğ ipliklerinde, sentromerde ya da kromozom yapısındaki bozukluklarla ortaya çıkabilir (Evans, 1990; Guttenbach ve Schmid, 1994).

Kemik iliği ve periferal kanda bulunan lökositlerde yapılan “mikronukleus testi”, in vivo sitogenetik analizidir ve genetik toksikolojide kullanılmaktadır. Ancak in vivo veya in vitro olarak diğer hücre gruplarına uygulanabilir bir metot değildir ve in vitro çekirdekli hücrelerde mikronukleusları (MN) ölçmek için metotlar geliştirilmiştir. MN testi; skorlanması oldukça kolay, ekstra kültür işlemi basamağı olmadan uygulanabilen ve farklı hücre tiplerinde kullanılabilen bir testtir. MN testi, klastojenik etkili bileşikler tarafından oluşturulan kromozomal hasarların değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan standart genotoksisite test sistemi içerisinde yer alır ve in vivo ve in vitro olarak uygulanabilir. MN'ler hücre döngüsü boyunca meydana gelen hasar nerede olursa olsun hücre bölünmesi süresince oluşur (Şekil 3.9). Araştırmacılar, kromozom fragmenti içerdiğini ve bu yöntemin anöploidi uyaran ajanları klastojenlerden ayırmada daha kesin bir yol olduğunu vurgulamışlardır.



Şekil 3.9. Klastojenler ve anojenler tarafından uyarılan hücrelerdeki MN'ler
(Şekeroğlu ve Şekeroğlu-Atlı, 2011)

Fenech ve Morley (1986) tarafından küf mantarlarının metabolitlerinden elde edilen sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüleriyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (Şekil 3.10). Cyt-B, bölünen hücrenin ikiye ayrılmasını uyararak mikrotübülleri oluşturacak olan aktin molekülüne bağlanarak aktin polimerizasyonunu inhibe etmektedir. Bu inhibisyonun dolayısıyla aktine bağlı tüm hareketler engellenmekte ve sitokinez inhibe olmaktadır.



Şekil 3.10. Sitokinezin bloklanması yöntemiyle MN içeren binükleat hücrenin oluşumu (Şekeroğlu ve Şekeroğlu-Atlı, 2011)

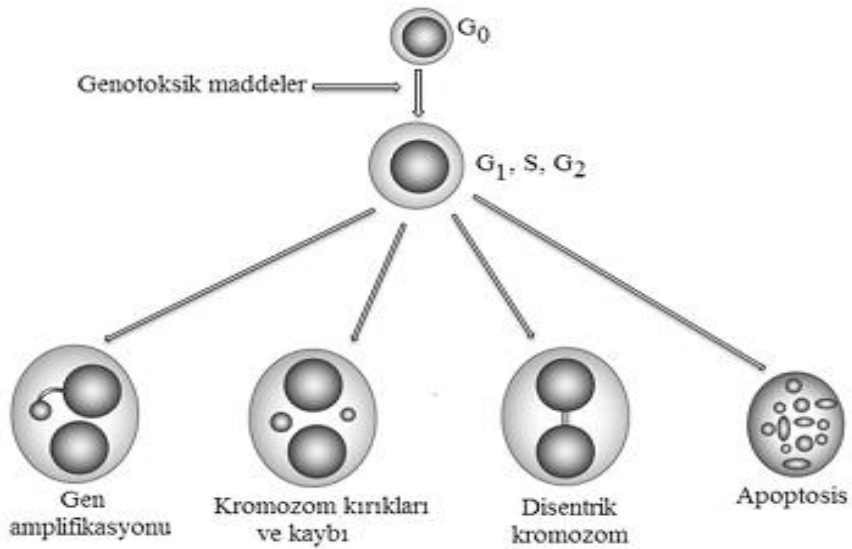
Sitokinezi bloklama metodu ile bazı kinetik problemler ortadan kalkmış ve in vitro MN tekniğinin uygulanmasındaki güvenilirlik artmıştır (Fenech, 2000; Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Choy, 2001; Demirel ve Zamani, 2002).

Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B eklenmesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücrelerde, MN bulduran hücrelerin oranı tespit edilmektedir (Fenech ve Morley, 1986., Demirel ve Zamani 2002). Sitokinezi bloklanmış hücrelerde binükleat hücreler ve MN sayımında şu kriterler kullanılmaktadır (Heddle ve Countryman, 1976., Titenko-Holland vd. 1997., Fenech, 2000):

1. Hücreler çift nükleusa sahip olmalıdır ve belirgin sitoplazmasıyla yuvarlak veya oval görünümlü olmalıdır.
2. Nükleuslar belirgin nükleus zarıyla çevrili yuvarlak veya oval olmalıdır.
3. MN çapı ana nükleusun 1/3'ü kadar veya daha küçük olmalıdır.
4. MN'ler yuvarlak ve oval şekillerde olmalıdır.
5. MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır veya mikronükleer sınırlar nükleer sınırlardan ayırt edilebilir olmalıdır.

Bu modifiye yöntem ile hücrelerin sadece MN içerip içermediği saptanmakta ve bu sayım işlemi kromozom anormallikleri testine göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Bütün halde kromozom şeklinde MN oluşumuna neden olan ve kromozomal anormallik testleriyle çalışılması güç olan anöploidiyi indükleyici ajanlar da bu testle kolaylıkla saptanabilmektedir (Aardema ve Kirsch-Volders, 2001; Lorge vd., 2007). Kimyasal bir madde uygulanmış hücrelerden oluşan yavru hücrelerdeki MN'lerin incelenmesi, en az bir hücre bölünmesi yoluyla yavru hücrelere geçen genetik hasarı ifade etmektedir. Yani iki çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması ile hücrenin bir kez bölünmüş olduğu ispatlanmış olur. Sitokinezi bloklanmış hücrelerde MN yöntemi kullanılarak kromozom kırıkları, kromozom kaybı, disentrik kromozom oluşumu gibi yeniden düzenlenmeler, gen amplifikasyonu ve apoptosis gibi olayların frekansı da değerlendirilebilir. MN içeriğindeki kromozomal fragmentler, direkt DNA kırıklarından veya DNA sentez hatalarından kaynaklanabilir. Onarılmamış kromozom kırıkları, bir disentrik kromozom ve bir asentrik fragment oluşumu ile yeniden düzenlenmelere öncüllük edebilir. Genellikle disentrik kromozomların sentromerleri anafazda nükleuslar arasında nükleoplazmik köprü oluşturur ve asentrik fragment MN'yi oluşturur (Şekil 3.11).

Asentrik fragmentlerin ve kromatid veya kromozom kırıklarının veya tam bir kromozomun anafazda geri kalması sonucu oluşan MN'ler, telofazdaki nükleusların dışında kalan küçük nükleuslar olarak görülmektedir (Surralles vd, 1995; Aardema ve Kirsch-Volders, 2001).



Şekil 3.11. Sitokinezi bloklanmış MN yöntemi ile bazı sitogenetik anormalliklerin belirlenmesi (Şekeroğlu, 2011).

Günümüzde MN'ı tespit etmek için yeni gelişmeler olmaktadır. Bu gelişmeler;

1. Kromozom parçalarından ve kromozomlardan orjin alan MN'ların ayırt edilmesi (Evans, 1977; Savage, 1993),
2. Bir hücre bölünmesi içinde kesip çıkartılarak tamir edilen (eksizyon tamiri) bölgelerin MN'lara dönüşmesi (Evans, 1990),
3. Binükleer hücrelerde non-disjunction olaylarını tanımlamak için moleküler problemlerin kullanılması (Dellarco, 1985; Guttenbach ve Schmid, 1994),
4. CBMN (Sitokinez Bloklü Mikronükleus) analizi içinde nekrotik ve apoptotik hücrelerin katılması (Natarajan ve Obe, 1982; Schmind, 1975).

Son olarak, yeni kimyasalların genotoksitesini test etmek için metafaz analizi yerine mikronükleus analizinin kullanılması önerilmektedir (Kisch-Volders, 1997; Kisch-Volders vd., 2000).

4. KAYNAK ÖZETLERİ

Bilinen bütün kimyasalların toksik etkileri bulunmaktadır. Kimyasallar, belirli bir dozdan sonra öldürücü etki gösterebilirler. Kimyasal maddelerin insan ve hayvanlarda oluşturduğu toksik etkiler akut ve kronik olarak gelişir. Bazı araştırmacılar akut toksisiteyi, tek ya da birkaç dozun 48 saat içinde deney hayvanlarında veya kaza sonucu insanlarda oluşturduğu etki olarak tanımlamaktadırlar. Akut toksisite saptanmasında başvuru deneylerinin amacı biyolojik sistemlerde kimyasal maddelerin toksik etkilerini belirlemek ve doz-yanıt ilişkisinde karakteristik veriler elde etmektir.

Brine-Shrimp Lethality (BSL) Assay sitotoksik testi, LD₅₀ düzeyinin tespitinde kullanılan toksisite testlerindedir. *Artemia salina* larvaları, farklı mikotoksinlere karşı geniş bir yelpazede duyarlılık gösterirler (Harwig ve Scott., 1971). Bu larvalar, günümüzde biyolojik aktiviteleri araştırılan örneklerin sitotoksikitesinin tayininde, oldukça geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla, toksik maddelerin in-vivo olarak *Artemia salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak "Brine-Shrimp Lethality Assay"ın kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Choudhary ve Thomsen, 2001). Toksikitesinin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. Ayrıca fungal toksinlerin, bitkisel ekstraktların, ağır metallerin, cyanobacteria toksinlerinin, pestisitlerin ve diş hekimliğinde kullanılan bazı maddelerin, sitotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılmıştır (Harwig ve Scott., 1971; Mc Laughlin vd., 1991; Solis vd., 1993; Martinez vd., 1998; Jaki vd., 1999; Barahona ve Sanchez-fortun., 1999; Gürkan vd., 2000; Uğur vd., 2000; Pelka vd., 2000; Ulusoylu vd., 2001). Bunlara ek olarak, embriyonel gelişim sürecini etkileyen teratojen maddelerin (Sleet ve Brendel., 1983) ve zirai amaca yönelik olarak oldukça sık kullanılan birçok antibiyotik, toksisite düzeylerinin tespitinde de kullanılmaktadır (Sanchez-fortun vd., 1996).

Artemia salina'nın kullanıldığı bazı akuatik toksisite testleri ile, rodentlerin (fare veya rat) kullanıldığı toksisite testleri arasında bir korelasyon olup olmadığını anlamak üzere bazı çalışmalar yapılmış ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Her iki testten elde edilen LD₅₀ değerleri, aynı kimyasalların insanlar için geçerli olan akut oral letalite verileriyle kıyaslandığında, sonuçlar arasında genellikle iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir. Benzer olarak, bu kimyasalların, oral akut toksisite potansiyellerinin test edilip, insanlar için geçerli olan akut dozlarla kıyaslandığında; akuatik testlerin, rodent testlerine nispeten biraz daha iyi sonuçlar

verdiği gözlemlenmiştir. Ancak akuatik toksisite testlerinin, suda çözünebilen maddelerin toksisite değerlerinin saptanmasında daha uygun olduğu belirtilmektedir (Calleja ve Persoone., 1992; Logarto vd., 2001; Karael, 2006) Yine başka bir çalışmada ise, *Artemia salina* ile yapılan bu testin modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile yapılan toksisite testlerinde alınan sonuçlarla karşılaştırılmış ve birbiriyle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Lewan vd., 1992,).

Perkloretilen, kuru temizleme başta olmak üzere, otomotiv ve diğer metalle ilgili sektörlerde metal üzerindeki yağları almak amacıyla kullanılan yanıcı olmayan fakat uçucu bir solventtir. Havada 1 ppm kadarlık bir miktarının bile insanlar tarafından fark edebilecek kadar keskin bir kokusu vardır. Diğer bütün klorlu solventler gibi perkloretilenin de sinir sistemi üzerinde depresan etkisi vardır. Buharıyla temas, baş dönmesi, baş ağrısı, uyku hali, bilinç kaybı yaratabilirken, devamlı olarak insan derisiyle temasta perkloretilen derideki yağı tümüyle çözeceğinden ciddi deri problemlerine neden olabilmektedir.

McLaughlin vd. (1997), TCE (trikloretilen) ve PERC (perkloroetilen) ile yapılan epidemiyoloji çalışmalarıyla renal kanser riski ile ilgili raporları gözden geçirdiklerinde; TCE veya PERC'e maruz kalma ile renal kanser riskinin artması arasında çok az kanıt olduğunu belirlemişlerdir.

Kuru temizleme sektöründe çalışanlarda tetrakloretilene biyolojik maruziyet değerlendirmesinin yapıldığı bir çalışmada, ABD'nin Ohio eyaletinin güneybatı bölgesindeki 4 kuru temizleme tesislerinden 18 kadın işçi üzerinde çalışmalar yapılmıştır (McKernan vd., 2008). Vardiya sonrası kadın işçilerin nefeslerinde bulunan tetrakloretilen'in çalıştıkları hafta boyunca yavaş yavaş arttığını ve istatistiksel olarak anlamlı bir kolerasyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Ancak, verilen nefesteki PERC miktarında çalışmadıkları 2 gün sonunda azalmalar olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yine PERC'e maruz kalan 18 kuru temizleme işçisi ile PERC'e maruz kalmayan 18 çamaşırhane işçisi üzerinde sitogenetik analiz çalışması yapılmıştır (Tucker vd., 2011). Bu iki ayrı işyerlerinde çalışanlar arasında kromozomal translokasyon frekansında anlamsız bir fark olduğunu belirlenmiş olmasına rağmen, bu işçilerin kanındaki PERC düzeyleri ile asentrik fragmentli hücrelerin yüzdesi arasında ($R^2 = 0,488$, $p < 0,026$) önemli bir korelasyon olduğunu saptanmıştır. Bu ölçülen kalıcı

kromozom translokasyon hasarı, PERC'e maruz kalan kuru temizleme işçileri üzerinde PERC'in güçlü bir etkisinin var gibi görünmediğini, ancak, PERC'e maruz kalma düzeyi ve asentrik fragment frekansları arasındaki ilişki nedeniyle PERC'e maruz kalan kişilerde geçici genetik hasara neden olabileceğini düşünülmektedir.

Rastkari vd. (2011), kuru temizleme işyerlerinde çalışanların idrarlarındaki PERC ve TCE'i biomarker olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmalarının sonunda kuru temizleme işyerlerindeki nefes alınan bölge ile çalışanların idrar konsantrasyonlarındaki perkloretilen'in ortalama değerleri arasında iyi bir korelasyon ($r = 0,907$) olduğunu gözlemlemişlerdir.

CD1 erkek farelere (Charles River UK, Ltd.'den temin edilmiş laboratuvar fareleri) oral yolla 1000 ve 2000 mg/kg/gün tetrakloroetilen verilmesinden sonra, farelerin karaciğer ve böbreklerdeki DNA hasarını Alkaline Comet Assay ile incelemişlerdir ve tetrakloroetilen'in farelerde karaciğer ve böbreklerde DNA hasarına sebep olmadığını saptamışlardır (Cederberg vd., 2010).

Aschengrau vd. (2009a) da Massachusetts'in Cape Cod bölgesindeki içme suyuna kontamine olmuş tetrakloroetilen (PERC) ile gebelikteki risk arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. PERC ile kontamine olmuş içme suyunun gebelik üzerinde etkisi hakkında çok az bilgi olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan retrospektif cohort çalışması sonucunda PERC maruz kalma seviyesiyle, gebelikte risk arasında kliniksel bir ilgi tespit edilmiş ancak gebelik kayıtlarında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

Yine, New York'un Endicott bölgesinde TCE ve PERC ile kontamine olmuş topraklardan buharlaşan havaya maruz kalan kadınlarda doğum sonuçlarının sıklığı araştırılmıştır. TCE ile kontamine olmuş bölgelerde ikamet eden kadınlar arasında düşük doğum ağırlığı ve fetal büyüme geriliği gibi önemli ölçüde ki hasarların, TCE'ye maruz kalma ile ilişkili olduğunu bulunmuştur. PERC'e maruz kalma ile düşük doğum ağırlığı ve fetal büyüme geriliği gibi hasarlar arasında ise önemli bir ilişki bulunamamıştır (Forand vd., 2012).

McDermott ve Heffron (2013), klorlu organik çözücülerden olan diklorometan (DMC), tetrakloroetilen (PERC), 1,2 dikloroetan (DCE) ve trikloroetilen (TCE)'in in vitro sitotoksik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, Jurkat T hücreleri 72 saat

ayrı ayrı çözücülere maruz bırakmış ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, hücre çoğalması, hücre içi serbest Ca (Ca^{+2}) konsantrasyonu ve kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür. ROS oluşumunda ve hücre içi serbest Ca^{+2} da konsantrasyona bağımlı bir artış olduğunu ve bunun hücre çoğalmasında bir azalmaya eşlik ettiğini saptamışlardır. Etki, 'PERC>TCE>DCM>DCE' sırasıyla azalmıştır. Kaspaz-3 aktivitesinin TCE ve PERC konsantrasyonuna bağılı bir şekilde arttığını, ancak DCM ile DCE de önemli bir değişiklik olmadığını da belirtmişlerdir.

Toraason vd. (1999), akut olarak trichloroetilen'e (TCE) ya da perchloroetilen'e (PERC) 0, 100, 500, 1000 mg/kg'lık miktarları da maruz kalan Fischer sıçanlarındaki oksidatif stres ve DNA hasarını incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda sadece TCE'nin uygulanan en yüksek doz (1000 mg/kg) verildiğinde sıçanların karaciğerinde oksidatif DNA hasarına neden olduğunu, PERC'in ise bu tip bir hasara neden olmadığını belirtmişlerdir.

Massachusetts'in Cape Cod bölgesindeki yetişkinlerin erken dönemlerdeki PERC'e maruz kalmalarının sonucunda depresyon oluşumu, bipolar (manik depresif) bozukluğu, travma sonrası stres bozukluğu ve şizofreni oluşumlarını etkileyip etkilemediğinin test edildiği bir retrospektif kohort çalışma 1969 ve 1983 yılları arasında doğan toplam 1378 kişi üzerinde yapılmıştır (Aschengrau vd., 2012). Bu kişilerin 831 tanesi doğum öncesinde ve erken çocukluk döneminde PERC'e maruz kalmış ve 547 kişi ise, PERC'e maruz kalmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda PERC'ye erken yaşlarda maruz kalmanın depresyon riski üzerinde anlamlı bir artış göstermediğini, bunun aksine PERC'e maruz kalmanın bipolar bozukluk ve travma sonrası stres bozukluğu üzerinde anlamlı derecede bir artışa neden olduğunu gözlemlenmiştir.

Janulewicz vd. (2008), Cape cod'da 1969 ile 1983 yılları arasında doğum kayıtları bulunan 2086 çocuk üzerinde yaptıkları bir kohort çalışma ile öğrenme dikkat ve davranış gelişimsel bozukluklarının doğum öncesi ve erken doğum sonrası dönemde PERC (perkloroetilen) ile kontamine olmuş içme suyuna maruz kalma arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Sonuçta, doğum öncesi ve erken doğum sonrası PERC'e maruz kalma ile dikkat, öğrenme ve anket yanıtları temelinde ve bu nüfusun yaşadığı bölgede PERC'e maruz kalmaları ile davranış bozuklukları arasında bir ilişki olmadığını rapor etmişlerdir.

Storm vd. (2013), New York'ta evlerinde kuru temizleme makinası olan veya olmayan ve sosyo-ekonomik açıdan eşitsizlik olan yetişkin ve çocukların yaşadığı mahalle sakinlerinin soluk alıp verdiği nefeslerde ve kandaki perklorotetilen seviyesi araştırmışlardır. Düşük bütçeli ev eşyası alanlardaki PERC seviyesinin, yüksek bütçeli eşya alanlara göre 6 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Kandaki ortalama perklorotetilen seviyesinin de düşük gelirli çocuklar ve yetişkinlerde, yüksek gelirli çocuk ve yetişkinlere göre 3 ve 4 kat daha fazla olduğu ve solunan havadaki perklorotetilen seviyesinin çocuklar ve düşük gelirli grupta sosyoekonomik açıdan fark oluşturduğunu ve düşük gelirli olanların yüksek gelirli olan gruba göre biraz daha fazla seviyede perkloroetilene maruz kaldıklarını belirtmişlerdir.

Aschengrau vd. (2009b), yaptıkları retrospektif kohort çalışmasında PERC ile kirlenmiş içme suyuna maruz kalan hamilelerden doğan 1,658 çocuk ve bu suya maruz kalmamış 2,999 çocuk arasında konjenital anomali görülme sıklığını incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları PERC ile kontamine olmuş içme suyuna maruz kalan kadınların çocuklarında bazı konjenital anomali risklerinde artış olduğunu bulmuşlardır. Ancak, konjenital anomalili çocuklar sınırlı sayıda olduğundan, elde edilen sonuçların sonuçların yeterli olmadığını ve PERC ile kontamine olmuş sulara maruz kalan daha fazla çocuk üzerinde bu çalışmanın tekrarlanması durumunda, daha net sonuçlara ulaşılabileceğini de belirtmişlerdir.

Kuzey ülkelerinde ki (Danimarka, Norveç, İsveç ve Finlandiya) 1970 nüfus sayımlarında belirlenmiş çamaşırhane ve kuru temizleme çalışanları üzerinde uygulanacak bir dizi vaka-kontrol çalışmasıyla kanser ile ilişkileri araştırılmış ve ABD bulguları ile Kuzey ülkeleri bulgularını karşılaştırılmıştır. Kuru temizleme ve çamaşırhane çalışanlarında, mide, kalp, karaciğer, pankreas, böbrek ve Hodgkin olmayan lenfoma kanseri risklerinde kayda değer bir artış görülmediğini ve kuru temizlemeyle doğrudan olarak, kadınlarda servikal kansere dair kayda değer bir artış bulunmadığı ancak mesane kanserine dair bir aşırı risk bulunduğu bildirilmiştir. Yine çalışma sonuçları, kuzey ülkeleri kuru temizlemecilerinde önemli olmayan yemek borusu kanseri riski bulgularının ABD bulgularından farklılık göstermediği de ortaya koymuştur (Lynge vd., 2006).

St. Louis'teki bir kuru temizlemeciler sendikasının 5369 üyesi arasındaki ölüm oranının takibiyle organik çözücülerle ilişkilendirilen kanserlerin riskini daha ileri seviyede değerlendirmek amacıyla incelemişlerdir. Bu iş yerlerinde çalışanlarda

amfizem, Hodgkin, yemek borusu kanseri, gırtlak kanseri, akciğer kanseri ve serviks kanseri için önemli bulgular gözlemlenmiştir. Ayrıca mesane kanserinin beyaz erkek ve kadınlar arasında; böbrek kanseri siyah erkek ve kadınlar arasında yükselişte olduğunu, fakat bu konuda elde edilen bulguların önem taşımadığını bildirmişlerdir. Her ne kadar daha yüksek seviyede maruziyete uğramış hastalarda gırtlak, akciğer ve böbrek kanserleri için bağıl riskler ve sendikaya 1960'tan sonra katılan kişilerde mesane kanseri ve kronik nefrit riskleri daha fazla olsa da bu ölüm sebeplerinin hiçbiri bu kişilerin çalışma süresi veya kuru temizleme çözücülerine tahmini maruz kalma seviyesi ile kuvvetli bir ilişki göstermedikleri gözlenmiştir (Blair vd., 2003).

Ruder vd. (2001) da, kuru temizleme iş yerlerinde çalışan kişilerin 1996 yılı itibariyle ölüm oranlarının analizini incelemişlerdir. Sendika kayıtlarına göre, 1708 kuru temizleme işçisinden oluşan bir ekibin 1960'tan en az bir yıl süreyle perkloroetilen'e (PERC) ve ayrıca pek çok işçinin de petrol bazlı bir kuru temizleme çözücüsü olan Stoddart çözücüsüne maruz kaldığını belirtilmiş ve dil, mesane, yemek borusu, bağırsak, akciğer ve rahim ağzı kanserlerin ile zatürree, mide ve on iki parmak bağırsağı hastalıklarındaki artışın bu kimyasallara maruz kalma ile istatistiki olarak tutarlı olduğunu ortaya konmuştur.

Mutajenik ajanlara maruz kalan insan popülasyonlarını izlemek için periferik kan lenfositlerinde, KA ve MN'lar kullanılmaktadır. Hagmar vd. 1998'de insan popülasyonlarında kendiliğinden oluşan KA'lar ile sonradan oluşan kanser sıklığı arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu belirlemişlerdir (Natarajan, 2002). Boveri 1914 yılı bildirisinde; kararlı kromozomal değişiklikler ile farklı kanser tipleri arasında ilişki olduğunu ileri sürmüştür (Natarajan, 2002). KA ile kanser sıklığı arasında anlamlı ilişki vardır, ancak bu ilişki KKD de bulunmamıştır. MN için henüz veriler yeterli sayıda değildir (Fenech vd., 1999).

WHO'nun 1985'teki bildirisine göre; KKD test yöntemi genotoksisite değerlendirmesinde kullanılan hassas bir metottur (Ribas vd., 1996). İlk kez Nicholas vd. (1979), diğer test sistemlerinde mutajenik olmayan bir kimyasalın KKD'leri indüklediğini saptamışlardır. Bu farkın sebeplerinden birisi; KKD'lerin düşük konsantrasyonlardaki kimyasal muameleler ile de indüklenbildiğidir. KA ve MN'lar daha yüksek konsantrasyonlardaki muameleler sonucu meydana geldiklerinden bu test yöntemlerine göre değerlendirilen bir kimyasal madde mutajenik olarak görülmezken, aynı kimyasal madde KKD test yöntemine göre

mutajenik olabilir (Nicholas vd., 1979). Çalışmalarında toksik olmayan veya letal olmayan konsantrasyonların KKD'leri indüklediğini, kromozom kırıkları veya diğer genetik etkileri gözlemek için gereken konsantrasyonların letal olabileceğini bildirmişlerdir (Nicholas vd., 1979). Tucker vd. (1993), ökaryotik hücrelerde KKD frekansının, DNA replikasyonu ile etkileşime girerek DNA hasarını indükleyen genotoksik ajanların etkisi ile arttığını bildirmişlerdir. Yager vd. (1993)'te, Giri ve Chatterjee (1998)'de., Shaham vd. (2001)'de, Giri vd. (2003)'de KKD frekansını genotoksik ajanları tanımlamak üzere kullandıklarını bildirmişlerdir.

MN test yöntemini sitogenetik anormallikleri belirlemede etkili bir metod yapan farklı hücre tiplerinde in vitro şartlarda yaygın uygulanabilirliği ve sayım kolaylığıdır. Ayrıca elde edilen verilerin çok sayıda olması istatistiksel dayanağının güçlü olmasını sağlar (Fenech vd., 1999). Fenech (1997)'de, Kirsch-Volders (1997)'de, Eastmond ve Tucker (1989)'de MN test yönteminde kinetokor veya sentromeri belirleyen metodlar kullanarak; kromozom kırığı nedenli MN ile kromozom geri kalması nedenli MN'ları birbirinden ayırmanın kolay olduğunu belirtmişlerdir (Fenech vd., 1999). İmmünokimyasal işaretleme metodları ile CBMN test yöntemi, MN oluşumundan sorumlu esas mekanizmanın anlaşılmasını sağlar. Çift iplik DNA kırıkları, asentrik fragmentli MN oluşumuna ve mitotik bölünmedeki hata, tam kromozomlu MN oluşumuna neden olmaktadır (Kirsch-Volders vd., 2003). Araştırmacılara göre, bu yöntem klastojenik ve aneujenik etkileri birbirinden ayırabilmekte ve Elhajouji vd.'nin 1997 yılı çalışma sonuçlarına göre ayrıca; doz-cevap eğrisi, tam kromozom ve kromozom ayrılmaması sonuçlarına uygulanabilmektedir (Kirsch-Volders vd., 2003). Bundan dolayı in vitro MN test yöntemi bilimsel olarak yeterli ve güçlü kabul edilmektedir (Kirsch-Volders vd., 2000). In vitro KA deneylerin de MI indüklenen hücresel toksisiteyi izlemek için kullanılır. MI, hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini verir. Azalmış MI, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı gösterir. Amorim vd. (2000)'de sitotoksikite derecesinin tespit edilmesinin, uygun preparasyon zamanını ve test konsantrasyonlarını seçmek için gerekli olduğunu ve özellikle sonuçların insanların maruz kalabileceği bileşiklerin risk değerlendirmesi için kullanıldığında önem taşıdığını bildirmişlerdir (Seligmann vd., 2003).

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Test Materyali

Bu çalışmada test maddesi olan Perkloroetilen (PERC)'in sitotoksik etkisini araştırmak için test materyali olarak Brine shrimp (*Artemia salina*) larvaları ve in vitro genotoksik etkisini belirleyebilmek için de saf PERC'in ve Aydın Bölgesi'nde faaliyet gösteren kuru temizleme iş yerlerinde PERC kimyasalına maruz kalmış çalışanlardan alınan insan periferel kan lenfositleri kullanılmıştır.

5.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

5.2.1. Perkloretilen (PERC)

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan renksiz bir sıvı olan PERC'in en önemli kimyasal özelliği kuvvetli bir solvent olmasıdır. Lenfosit kan kültürüne 24. saatte 1mM, 3mM ve 5mM konsantrasyonlarda olacak şekilde ilave edilmiştir. PERC'e ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı: Tetrachloroethylene

Kapalı formülü: C₂Cl₄

Molekül ağırlığı: 334,33 g/mol

Yoğunluğu: 165,83 g/mol

Saflık düzeyi: ≥ %99,9

Suda çözünürlüğü: 0,015 g/100 ml (20 °C)

Kaynama noktası: 121,1 °C

Erime noktası: -19 °C

CAS No: 127-18-4

Sigma No: 371696

Sinonimler: Etilen tetraklorür, tetrakloretilen, perkloretilen, karbon biklorür, karbon diklorür

5.2.2. Mitomycin C (MMC)

Mitomycin C, bu çalışmanın pozitif kontrolü olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: 6-Amino-1,1a,2,8,8a,8b-hexahydro-8-(hydroxymethyl)-8amethoxy-5-methylazirino[2',3':3,4] pyrrolo[1,2-a]indole-4,7-dione carbamate (ester)

Kapalı formülü: C₁₅H₁₈N₄O₅

Molekül ağırlığı: 334,33 g/mol

Erime noktası: >360 °C

CAS No: 50-07-7

Sigma No: M 0503

5.2.3. Dimetil Sülfoksit (DMSO)

DMSO, bu çalışmada PERC'in eriticisi (negatif kontrol) olarak kullanılmıştır.

Kimyasal adı: Dimethyl Sulfoxide

Kapalı formülü: C₂H₆SO yahut (CH₃)₂SO

Molekül ağırlığı: 78.13 g/mol

Yoğunluğu: 1.1 g/cm³

Kaynama noktası: 189 °C

Erime noktası: 16-19 °C

Saflık düzeyi: ≥ %99.9

CAS No: 67-68-5

Sigma No: 8418

5.2.4. Kromozom Medyumu

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

MEM JOKLIK with

Non essential Amino Acids: 850 ml

Fetal Calf Serum: 150 ml

Heparin: 25.000 E

Penicillin G, Sodium Salt:	75.000 E
Streptomycin Sulphate:	50 mg
Phytohemagglutinin L:	2.5 mg

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

5.2.5. Kolsemid

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak kullanılmıştır. Sigma marka kosemid eriği 10ml hacinde olup 10 µg/ml konsantrasyonda steril şişe içerisinde hazır olarak bulunmaktadır ve kromozom medyumunun her mililitresinde 0.06µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolsemide ait özellikler aşağıda verilmiştir.

Kimyasal adı: Demecolcine Solution

Kapalı formülü: C₂₁H₂₅NO₅

Molekül ağırlığı: 78.13 g/mol

Konsantrasyonu: 10 µg/ml in HBSS

Saklanma sıcaklığı: 2-8 °C

Cat No: 477-30-5

Sigma No: D 1925

Sinonimler: Colcemid solution, N-Deacetyl-N-methylcolchicine solution

5.2.6. Sitokalsin B

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

Kimyasal adı: Cytochalasin B

Kapalı formülü: C₂₉H₃₇NO₅

Molekül ağırlığı: 479,61 g/mol

Erime noktası: 218-223 °C

Kaynama noktası: 218-223 °C

Saflık düzeyi: %98

CAS No: 14930-96

Sigma No: C-6762 (5mg)

5.2.7. 5'-Bromo 2'- deoksiüridin (BrdUrd)

BrdUrd kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını belirleyebilmek amacıyla kullanılmıştır. BrdUrd eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmıştır. Bu eriyikten 50µl 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

Sinonimler: 5-BrdU, 5-Bromo-1-(2-deoxy-β-D-ribofuranosyl)uracil, 5-Bromouracil deoxyriboside, BUdR

5.2.8. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidistile su içerisinde stok halinde hazırlanıp, ağzı kapalı cam kap içerisinde buzdolabında (+4°C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık bir saat önce yeterli miktarda hipotonik eriyik alınmış, 37°C'deki inkübatörde ısıtılarak kullanılmıştır.

5.2.9. Fiksatif

KKD ve KA deneylerinde yapılacak olan preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 hacim asetik asit'in 3 hacim metanol (1/3: glasiyal asetik asit/metil alkol) ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır.

MN deneyleri için birinci fiksatif, 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol ve 6 hacim %0,9 NaCl (1/5/6 glasiyal asetik asit/metanol/% 0,9'lük NaCl) karıştırılarak hazırlanmıştır. Diğer iki fiksatif ise 1 hacim glasiyal asetik asit ve 5 hacim metanol'ün (1/5 glasiyal asetik asit/metanol) karıştırılması ile

hazırlanmıştır. Fiksatifler, her preparasyonda kullanılmadan iki saat önce hazırlanarak buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

5.2.10. Sorensen Tamponu

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

Hazırlanışı:

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

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.

5.2.11. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği

11,05 gr trisodyum 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 sodyum klorür (NaCl) tartılarak yine saf su içerisinde ancak ayrı bir kapta eritilmiştir. Sonra bu iki 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.

5.2.12. Giemsa

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

5.2.13. Entellan

Hazırlanan preparatları kapatmak için kullanılan şeffaf yapışkan sıvıdır (Merck, Cat. No. 7961). Lam ile lameli birbirine yapıştırarak preparatları daimi hale getirmek amacıyla kullanılmıştır.

5.2.14. Nitrik Asit (HNO₃)

1N HNO₃ (Fluka, Cat. No. 35315) çözeltisi lamları temizlemek amacıyla kullanılmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

5.3. Yöntem/Araştırma Teknikleri

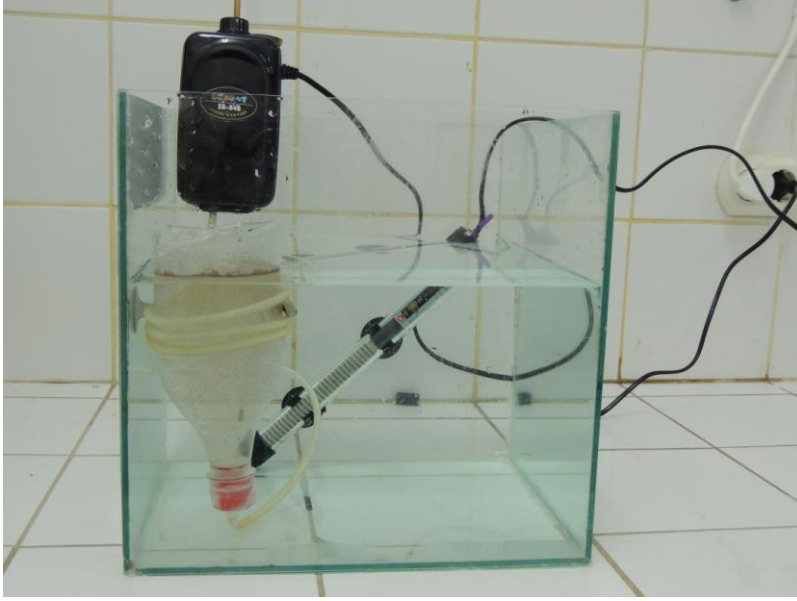
5.3.1. Perkloretilen (PERC)'in Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay (BSL) ile Sitotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Artemia salina, günümüzde laboratuvar denemelerinde kullanılan bir canlıdır. Perkloretilen (PERC)'in Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality Assay (BSL) ile sitotoksik etkisinin belirlenmesi için Solis vd.'nin (1993) yöntemi modifiye edilerek uygulanmıştır. İşlem basamakları aşağıdaki gibidir:

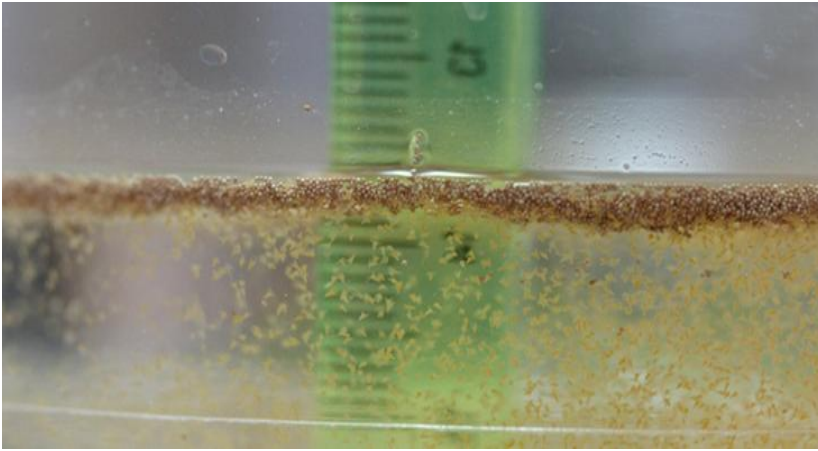
1. Isısı bir su ısıtıcısı ile 28°C'ye ayarlanmış olan su dolu küçük bir akvaryumun içerisine *Artemia* yaşam ortamını barındırması amacıyla konik, dipten havalandırmalı bir şişe yerleştirilmiştir (Şekil 5.2).
2. Şişenin içerisine pH'sı 8.8'e ayarlanmış 300 -350 ml distile su konmuştur.
3. Ticari olarak satın alınan JBL marka Brine Shrimp kistleri 3,6 g/100 mL olacak şekilde konik şişenin içerisine ilave edilmiş ve kistler 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 5.3).
4. İnkübasyonun ardından larvaların (nauplii) kolaylıkla seçilip, toplanabilmesi için, ışığa yönelim hareketlerinden faydalanılmış ve kabın dış yüzeyine doğru toplanmaları için bir ışık kaynağı kullanılmıştır.
5. Yaşam ortamı ile birlikte bir pasteur pipeti yardımıyla alınan larvalar küçük bir petri içerisine bırakılmış ve 100µl'lik bir mikropipet yardımıyla

(larvaları yaralamamak ve öldürmemek için pipet ucu bir makasla hafifçe kesilmiştir) küçük petriden alınan larvalar; sayım yapmak için daha geniş bir petriye küçük damlalar halinde bırakılmışlardır.

6. 96'lık bir well-plate içerisine her her bir kuyucuğa, canlı olarak seçilen 10'ar tane *Artemia* larvası konmuş ve içerisinde *Artemia* larvaları bulunan her bir kuyucuğa 100µl deniz suyu ilave edilmiştir.
7. PERC'in *Artemia salina* larvaları üzerindeki potansiyel sitotoksik etkisini belirleyebilmek için öncelikle PERC'in denemelerde kullanılacak konsantrasyonları hazırlanmıştır. PERC kimyasal yapısı nedeni ile suda çözünmediği için, 1/1 oranın da ethanol ile çözdürülüp daha sonra üzeri distile su ile tamamlanmıştır.
8. PERC konsantrasyonları 2x olacak şekilde 1000, 100 ve 10 ppm olacak şekilde, her bir grup için ayrı ayrı hazırlanmıştır.
9. Hazırlanan her bir PERC konsantrasyonundan her bir kuyucuğa 100 µl ilave edilmiş (kuyucuk toplam hacmi 200 µl) ve larvalar 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
10. PERC ethanol ile çözdürüldüğü için aynı miktar kadar ethanol de negatif kontrol olarak ve pozitif kontrol olarak da Mitomycin-C (MMC; 1.65 µg/µl) kullanılmıştır.
11. 24 saatlik inkübasyonun ardından well-platelerdeki her bir kuyucuk stereo mikroskop altında incelenmiş ve canlı ile ölü *Artemia* larvaları sayılıp not edilmiştir.
12. Sonuçlar SPSS 16.0 istatistik paket programında Probit analizi ile değerlendirilmiş ve LC₅₀ değerleri ile %95 güvenilirlik sınırları hesaplanmıştır. Deneyler üç paralel olarak tekrarlanmıştır.



Şekil 5.2. *Artemia salina* yetiştirme ortamı



Şekil 5.3. 48 saatlik inkübasyon sonucu yumurtadan çıkan *Artemia salina* larvaları

5.3.2. Perkloretilen'in Kuru Temizleme Çalışanları Periferal Lenfositleri Üzerindeki in vitro Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi

5.3.2.1. Deney ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Aydın bölgesinde faaliyet gösteren kuru temizleme işyerlerinde çalışan yaş aralıkları 20 - 54 arasında olan ve en az bir yıldır aynı iş yerinde çalışan gönüllü 10 sağlıklı erkek deney grubu olarak, yine aynı yaş aralıklarında olan ve aynı yaş aralığında olan kuru temizleme ile ilgisi olmayan, sigara içmeyen, kronik olarak ilaç kullanmayan gönüllü 10 sağlıklı erkek, kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Çalışma, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.03.2012 tarih ve 8 sayılı kararı ile alınan Etik Kurul Onayı ile gerçekleştirilmiştir (Ek 1). Çalışmaya davet edilen gönüllülerden katılmayı kabul edenler, ayrı ayrı değerlendirilmiş ve anlaşma sağlanan ve alınma ve dışlama ölçütlerine uygun olan gönüllüler çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan bu gönüllülere araştırma hakkında bilgi verilmiş ve gönüllülerin kendilerinden yazılı bilgilendirilmiş olur alınmıştır (Ek 2).

Denemeye gönüllü olarak katılan toplam 20 kişiden 5 ml hacminde alınan kan örnekleri, steril ve vakumlu, kanın pıhtılaşmasını önleyecek şekilde Lityum-Heparinli tüplere konulmuştur. Kişilerden alınan kanlar tüplere alındıktan sonra hafifçe çalkanarak, kanın Lityum-Heparin ile etkileşmesi sağlanmıştır.

Denemelerde ayrıca saf PERC (1mM, 3mM ve 5mM) ve negatif kontrol olarak DMSO (4µL/ml) ve pozitif kontrol olarak da 0.2 µg/ml mitomisin (MMC) kullanılmıştır.

5.3.2.2. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) ve Kromozomal Anormallikleri (KA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

5.3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Aydın bölgesinde faaliyet gösteren kuru temizleme işyerlerinde çalışan ve PERC'e maruz kaldığı düşünülen, 10 çalışan (22-54 yaşları arasında erkek) ve kontrol grubu olarak da PERC'e maruz kalmayan, sigara kullanmayan 10 kişi (22 - 54 yaş

aralığında erkek) olmak üzere toplam 20 kişiden yapılan gönüllü olur formu (Ek 2) ve etik kurulu raporu (Ek 1) doğrultusunda, steril enjektörlerle periferik kan alınmıştır. Bu kişilerden alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örneklerinden 0.2 ml'si steril şartlarda kromozom medyumlarına ekilmiştir. Yine steril şartlarda daha önceden hazırlanan BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg BrdUrd/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir.

Aynı şekilde, PERC'in in vitro genotoksik etkisini araştırmak amacı ile aynı yaş grubunda (26-29 yaş aralığı) sağlıklı ve sigara içmeyen 3 erkekte steril şartlarda 1/10 heparinize edilmiş periferik kan alınmış ve bu kanın 0.2 ml'si 2.5 ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda ekilmiştir. Yine steril şartlarda daha önceden hazırlanan BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg BrdUrd/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat boyunca inkübe edilmiştir. PERC'in belirlenen 3 farklı konsantrasyonu (1mM, 3mM ve 5mM) kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesine 48 saat boyunca maruz kalmaları sağlanmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak Mitomycin C (MMC) (0.2 µg/ml), negatif kontrol olarak DMSO (4 µl/ml) kullanılmıştır.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe kolsemid eriyiğinden son konsantrasyonu 0.06 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C 'de) kolsemid ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri, 800 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5 - 0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C 'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmıştır. Hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 5 ml'lik hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konulmuştur. Hücreler 30 dk hipotonik eriyikte 37°C 'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda her bir tüpe 1'er damla soğuk fiksatif ilave edilmiştir ve 15 dk 1200 rpm'de santrifüj edilerek, süpernatant atılmıştır.

Daha sonra hipotonik eriyik ilavesi gibi her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200

rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere (bazen 4 kere) tekrarlanmıştır. Fiksatifle 3 kez muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5 - 0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparatlar yapılmıştır.

Tüpün dibinde toplanan 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 soğuk fiksatif içerisinde buzdolabında saklanan lamın üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir.

5.3.2.2.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)'in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzerini bir film gibi örtecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın distile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği görülmüştür. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen tek ultraviyole lambası ile 30 dk ışınlanmıştır. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58 - 60°C arasındaki sıcaklıklarda 45 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk Önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlanmıştır. %5'lik Giemsa boyası, 7.5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa'nın karıştırılarak üzerleri 82.5 ml saf su ile tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC eriyiğinden

alınarak direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 12 dk boya içerisinde bekletilmiştir (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

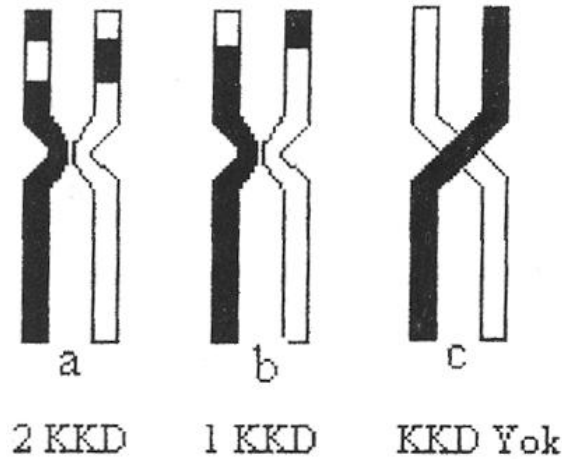
5.3.2.2.3. Mikroskobik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (100X10=1000 büyütme). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi sayısı (KKD) ve kromozomal anormallikler (KA) belirlenmiştir. Aynı preparatlarda birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı belirlenmiştir ve bu incelemeler sonunda proliferasyon indeksi (PI) ve mitotik indeks (MI) de saptanmıştır.

5.3.2.2.4. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)/Hücre Sayısının ve Proliferasyon İndeksinin (PI) (Replikasyon İndeksi=RI) Saptanması

5.3.2.2.4.1. KKD/Hücre Sayısının Saptanması

KKD/Hücre sayısı, her bir kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 50 hücrede belirlenmiştir. 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. Uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayılmıştır. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumda kromozomlarda KKD yoktur (Topaktaş ve Speit, 1990) (Şekil 5.4).



Şekil 5.4. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

5.3.2.2.4.2. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi = PI) Hesaplanması

PERC'in periferik lenfositlerde DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla replikasyon indeksi (RI) hesaplanmıştır. Çalışmalarda kullanılan her kişiye ait kan kültürlerinden 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:

$$RI = 1 \times (M1) + 2 \times (M2) + 3 \times (M3) / 100$$

M1: Birinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

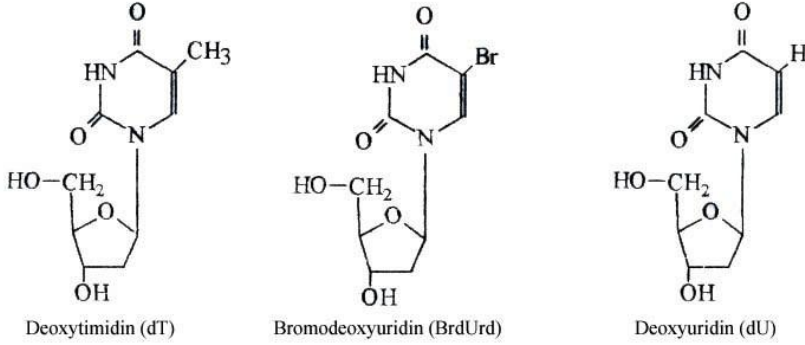
M2: İkinci mitozu geçiren hücrelerin sayısı

M3: Üçüncü mitozu geçiren hücrelerin sayısı

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilmesinde izlenen yollar şu şekildedir (Topaktaş ve Speit, 1990):

BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen

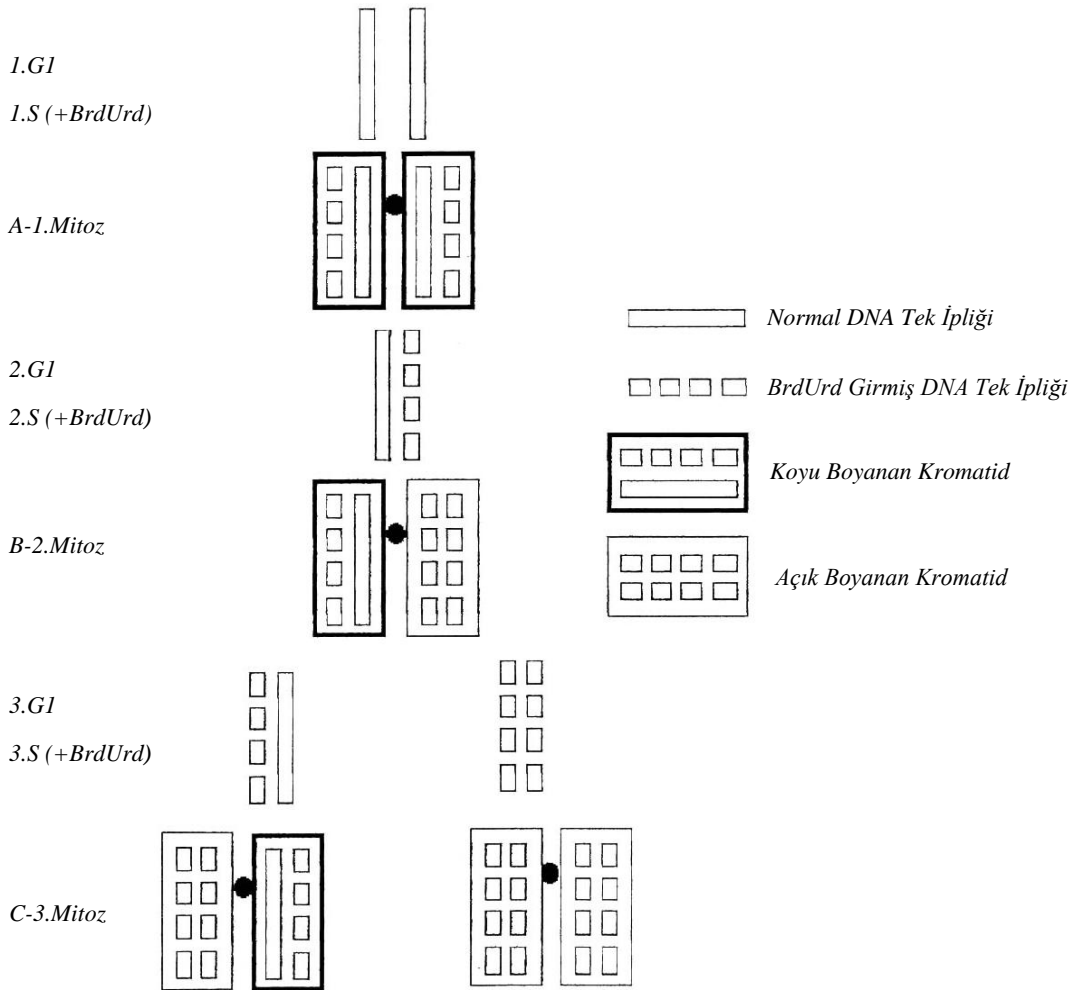
halkasındaki beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci C atomuna bağlanan grup dT'de CH₃, BrdUrd'de Br ve dU'de H atomudur (Şekil 5.5).



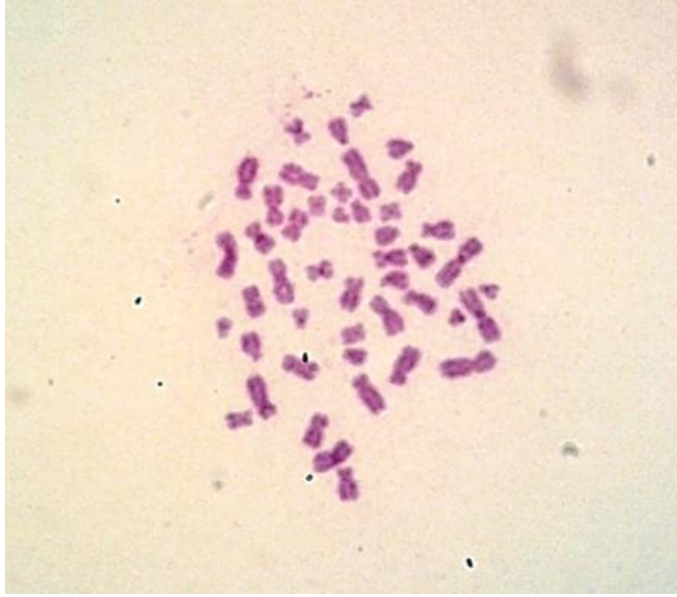
Şekil 5.5. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları

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 5.6-A ve Şekil 5.7). 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 5.6-B ve Şekil 5.8). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda üçüncü S fazı) ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdUrd girmiş

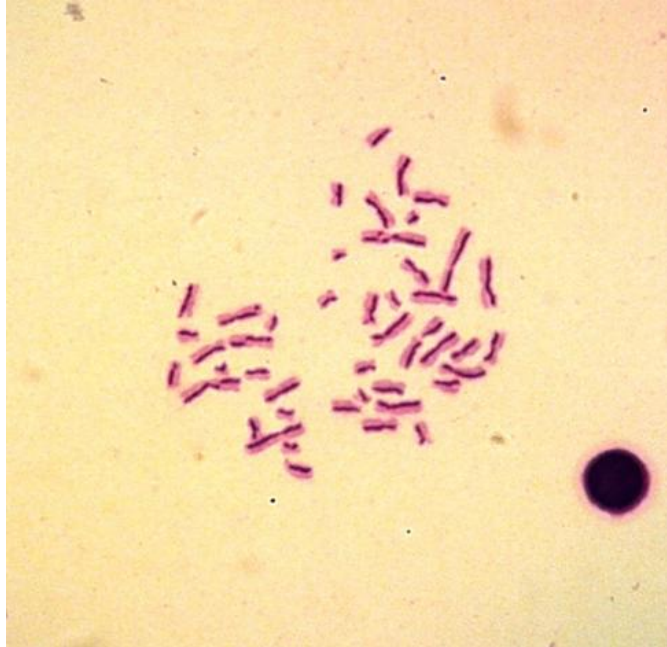
olan bir kromozom meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd: BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidinin bir ipliği BrdUrd'li diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozomda boyandığında bir kromatidi koyu renkte, diğer kromatidi açık renkte olacaktır (dT/BrdUrd: BrdUrd/BrdUrd) (Şekil 5.6-C ve Şekil 5.9).



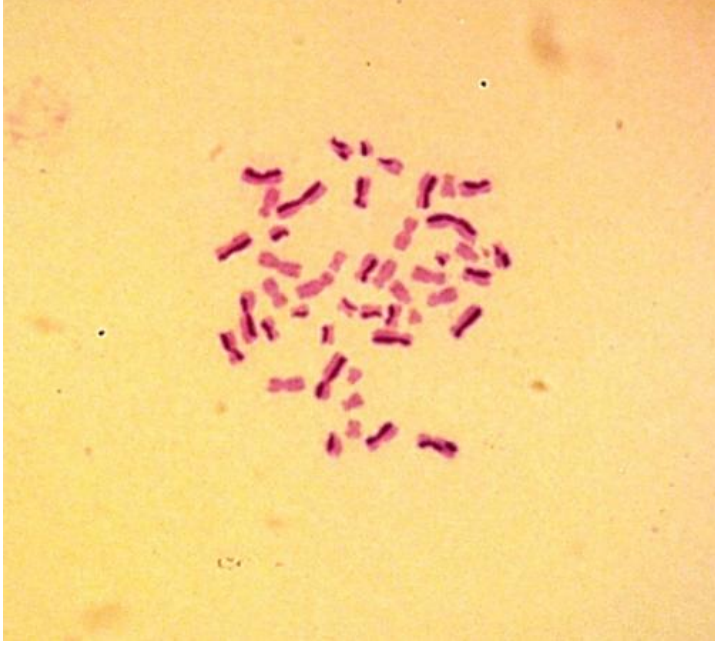
Şekil 5.6. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile birinci, ikinci ve üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During, 1985: Topaktaş ve Speit, 1990'dan)



Şekil 5.7. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (X1000).



Şekil 5.8. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (X1000).



Şekil 5.9. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (X1000).

5.3.2.2.5. Kromozom Aberasyonu (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

5.3.2.2.5.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Kromozom aberasyonu (KA)'yı belirleyebilmek amacıyla deneme ve kontrol gruplarındaki her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre incelenmiştir. Bu hücrelerde gözlenen kromozom yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. İncelenen bu 100 hücre içinde hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliklerinin (Yapısal KA/Hücre) sayısı ile anormallik içeren hücrelerin yüzdesi bulunmuştur.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıkları arasındaki farklar, Kauderer ve arkadaşlarının (1991) bildirdiğine göre, Preston (1987), 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. Bu çalışmada kromatid kırığı ve tek kol birleşmesi gibi anormallikler kromatid tipi anormallik olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kromozom kırığı, kromatid kırığı, sister union, kromatid değişimi, halka kromozom ve disentrik kromozom oluşumu gibi anormallikler de kromozom tipi anormallikler olarak değerlendirilmiştir.

5.3.2.2.5.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

PERC'in periferik lenfositlerde mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MI'de saptanmıştır. MI'i saptamak amacıyla her bir kişiye ait preparatlarda toplam 1000 hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 1000 hücre içinde mitoz geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

5.3.2.3. Mikronukleus (MN) Oluşumunu Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, PERC'in Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

5.3.2.3.1 Hücre Kültürünün Yapılması ve PERC'in Kültüre İlave Edilmesi

In vitro mikronukleus testinde Rothfuss ve ark. (2000)'nın geliştirdikleri yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu yöntemde göre, Aydın bölgesinde kuru temizleme iş yerlerinde çalışan ve PERC'e maruz kaldığı düşünülen 10 çalışan (22 - 54 yaş aralığında erkek) ve kontrol grubu olarak PERC'e maruz kalmayan 10 kişi (22 - 54 yaş aralığında erkek) olmak üzere toplam 20 bireyden gönüllü olur formu (Ek 2) ve etik kurulu raporu (Ek 1) doğrultusunda, steril enjektörlerle periferik kan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş tüplere aktarılmıştır. Heparinize edilmiş tüplerdeki kandan 0.2 ml alınarak, steril şartlarda 2.5 ml kromozom medyumuna ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat boyunca inkübe yapılmıştır.

Aynı şekilde, PERC'in periferik lenfositler üzerindeki in vitro genotoksik etkisini araştırmak amacı ile, aynı yaş grubunda (26-29 yaş aralığı) sağlıklı ve sigara içmeyen 3 erkekten steril şartlarda 1/10 heparinize edilmiş periferik kan alınmış ve bu kanın 0.2 ml'si 2.5 ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat boyunca inkübe edilmiştir. PERC'in

belirlenen 3 farklı konsantrasyonu (1mM, 3mM ve 5mM) kültür ortamına kültürün başlangıcından 24 saat sonra ilave edilmiş ve hücrelerin test maddesiyle 48 saat boyunca muamele edilmeleri sağlanmıştır. Ayrıca 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak mitomisin C (MMC) kullanılmıştır. MMC tüplere 0.2 µg/ml olacak şekilde verilmiştir. Negatif kontrol olarak da DMSO (4 µl/ml) kullanılmıştır.

İki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültürün 44. saatinde bütün tüplere 6 µg/ml olacak şekilde sitokalsin B (Cytochalasin B, Sigma cat. no. C6762) ilave edilmiştir.

Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde kültür tüpleri 800 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5 - 0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37°C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırarak yapılmıştır. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 5 dk hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk 1200 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.

Hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımınının 1/1 oranında % 0.9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 2 kere tekrarlanmış ve ilk fiksatiften farklı karışımlar kullanılmıştır (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). Üçüncü kez fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0.5 - 0.7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçilmiştir.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan

lamın üzerine farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletilmiştir.

5.3.2.3.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar Sorensen tamponu ile hazırlanmış %5'lik giemsa boyası ile boyanmıştır.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır (pH=6.8). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzülmüştür. Kurduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 12 dk boya içerisinde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarılmış, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlanmıştır. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir.

5.3.2.3.3. Mikronükleus Sayımı için Mikroskopik İncelemenin Yapılması

Hazırlanan daimi preparatlar Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskopunda 10 X 40 = 400 büyütmede incelenmiştir.

5.3.2.3.4. Mikronükleus Sayısının Saptanması

Mikronükleus sayısını saptamak amacıyla çalışmada kullanılan her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin her muamele grubu ve kontrollerinde iki nükleusa sahip (binükleer) toplam 1000 hücre incelenmiştir. Bu binükleer hücreler içerisinden mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Mikronükleus taşıyan iki nükleuslu hücrelerin toplam hücre sayısına oranlaması ile mikronükleuslu hücre oranı, toplam mikronükleus sayısının incelenen iki nükleuslu hücre sayısına bölünmesiyle ise hücre başına düşen mikronükleus sayısı (MN/Hücre) hesaplanmıştır. Bundan da MN %'si belirlenmiştir.

Binükleer hücre ve mikronükleus ayırımı Titenko-Holland vd. (1997) ve Fenech (2000)'e göre yapılmıştır.

5.3.2.3.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi marka binoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinasında 1000 büyütmede yapılmıştır (Nikon Eclipse E600). Daha önce 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin incelenmesi sırasında rastlanan bazı ilginç kromozom anormalliklerin ve mikronükleuslu binükleer (iki nükleuslu) hücrelerin birkaç örneğinin fotoğrafları çekilmiştir.

5.3.3. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KKD, KA, PI, MI, ve MN parametrelerine ait veriler için önce her bir grubun ortalamaları arasındaki farkın önemli olup olmadığı tek yönlü varyans analiz metodu ile belirlenmiş, farkın önemli olduğu gruplarda ise, muameleli gruplardan elde edilen sonuçlar ile onların kontrolleri (kontrol, eritici kontrol ve pozitif kontrol) arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile karşılaştırılmıştır.

Doz-etki ilişkisini belirlemek amacıyla regresyon doğrusu (eğim çizgisi) çizilmiştir. Ayrıca, mikroskobik incelemeler sonucunda elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality (BSL) Assay

Toksisite testinden elde edilen veriler, hesaplanmış ve LD₅₀ değerleri ile birlikte üst ve alt % 95 güvenilirlik sınırları ortaya konulmuştur. Sonuçların toksisite derecelendirilmeleri ise Çizelge 6.1. deki referans değerlerine göre yapılmıştır (Brayn vd.,1997).

Çizelge 6.1. Toksisite derecesi değerlendirilmesinde kullanılan referans değerleri (Brayn vd., 1997)

Toksisite Derecesi	LD ₅₀ Limitleri
Oldukça Toksik	< 10 µg/ml
Toksik	> 10 µl/ml
Zararlı	> 100 µl/ml
Toksik Değil	> 1000 µl/ml

PERC, kimyasal yapısı nedeni ile suda çözünmediği için, 1/1 oranında Ethanol ile çözdürülmüş, daha sonra gerekli miktarlar su ile tamamlanarak, gerekli konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Kullanılan PERC, Ethanol ve MMC'e ait toksisite testi sonuçları ise Çizelge 6.2.' de gösterilmiştir.

Çizelge 6.2. Brine Shrimp (*Artemia salina*) Lethality (BSL) Assay LD₅₀ limitleri p>0.05 seviyesinde önemli PERC: Perkloroetilen

Uygulama Grubu	LD ₅₀ Limitleri (ppm)
Ethanol	> 1000
MMC	> 10
PERC	> 1000

Probit analiziyle değerlendirilmesi yapılan veriler ($p>0.05$) incelendiğinde, PERC'in kullanılan konsantrasyon aralığında (10, 100, ve 1000 ppm) LC_{50} değerlerine ulaşmadığı görülmektedir. PERC'in denemede kullanılan konsantrasyonları hemen hemen kontrol ile aynı değerleri vermiş (sırası ile; kontrol: % 6.66, PERC 10 ppm: % 6.33, PERC 100 ppm: % 5.33, PERC 1000 ppm: % 4.33 ve Ethanol: %6.33) ve bu değerlerin de istatistiki olarak anlamlı sonuçlar ortaya koymadığı gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler PERC'in $100\mu\text{g/ml}$ – $1000\mu\text{g/ml}$ arasında bulunan LC_{50} değerleri, alt ve üst güvenlik sınırları itibariyle toksisite sınırları içerisinde yer aldığını, bu konsantrasyon aralıkları içinde toksik olmadığını ortaya koymuştur (Çizelge 6.3).

Çizelge 6.3. *Artemia salina* larvalarında gözlenen % ort. canlılık değeri

Uygulama Grubu	Konsantrasyon	Ortalama Canlılık \pm SH
Kontrol	0	6,66 \pm 0,666
Ethanol	100 ppm	6,33 \pm 0,333
MMC	100 ppm	3,33 \pm 0,333
	135 ppm	3,00 \pm 0,000
	270 ppm	2,66 \pm 0,333
PERC	10 ppm	6,33 \pm 0,333
	100 ppm	5,33 \pm 0,882
	1000 ppm	4,33 \pm 0,333

6.2. PERC ile Direk Muamele Edilmiş Periferik Kan Lenfositlerindeki *in vitro* Genotoksik Etkinin Belirlenmesi

6.2.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkiler

PERC'in farklı konsantrasyonları (1mM, 3mM ve 5mM) ile 48 saatlik muamele edilen insan lenfosit kültürlerinde 3 donörde gözlenen total KKD/hücre değerleri Çizelge 6.4'de verilmiştir.

KKD test yönteminde deneysel birim hücredir. Her bir konsantrasyon ve muamele süresi için ikinci mitoz bölünmeyi geçiren 50 iyi dağılmış metafaz hücresi

sayılmıştır. Sayılan 50 hücrenin tamamı KKD içermektedir. Dolayısı ile KKD testinin analizinde KKD içeren hücreler değil, hücre başına düşen KKD sayıları değerlendirilerek test edilen kimyasalın genotoksitesisi değerlendirilmiştir.

3 donörün total verilerine bakıldığında, PERC'in tüm konsantrasyonları 48 saat muamele sonucu, ortalama KKD/hücre sayısında hem kontrole hem de eritici (negatif) kontrole göre anlamlı artışa neden olmuştur (Çizelge 6.4; Şekil 6.1). Bu artış konsantrasyon artışına bağlı olarak ortaya çıkmıştır. Ancak, PERC muamelesi sonucu görülen bu artış, pozitif kontrol olan MMC'de görülen KKD/hücre sayısı (38.71 ± 4.716) ile karşılaştırıldığında sadece 5mM konsantrasyondaki PERC de anlamlı bulunmuştur. 48 saat muameleli gruplarda gözlenen sonuçlara göre, doz-cevap eğrisi Şekil. 6.2'de gösterilmiştir.

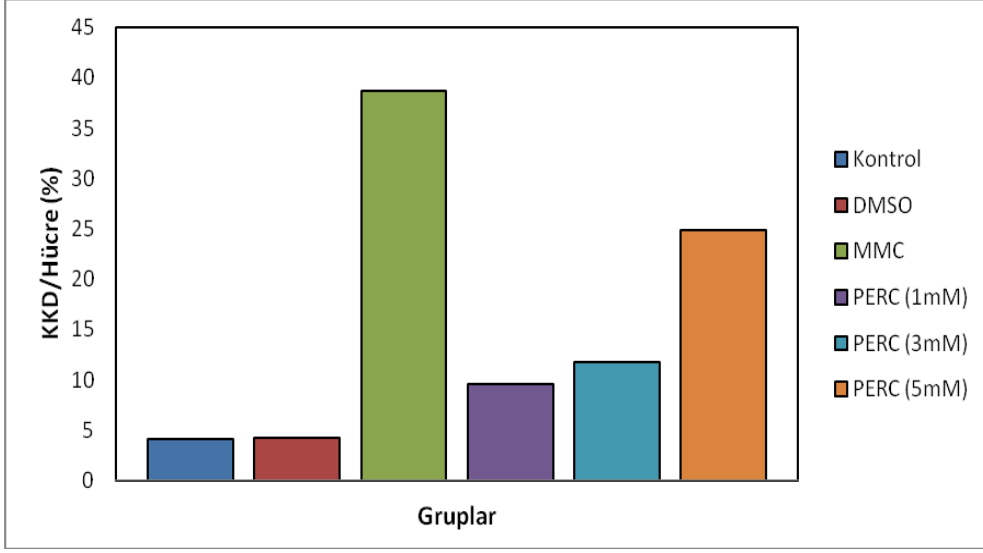
Çizelge 6.4. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD)

Grup	N	Konsant.	Min – Max KKD	KKD/Hücre \pm SH
Kontrol	3	-	2-14	4.16 \pm 0.323
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4 μ l/ml	2-14	4.23 \pm 0.173
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2 μ g/ml	7-66	38.71 \pm 4.716
PERC ile muamele	3	1mM	4-26	9.53 \pm 1.666 abc
	3	3mM	5-29	11.8 \pm 0.886 abc
	3	5mM*	9-47	24.84 \pm 5.912 ab

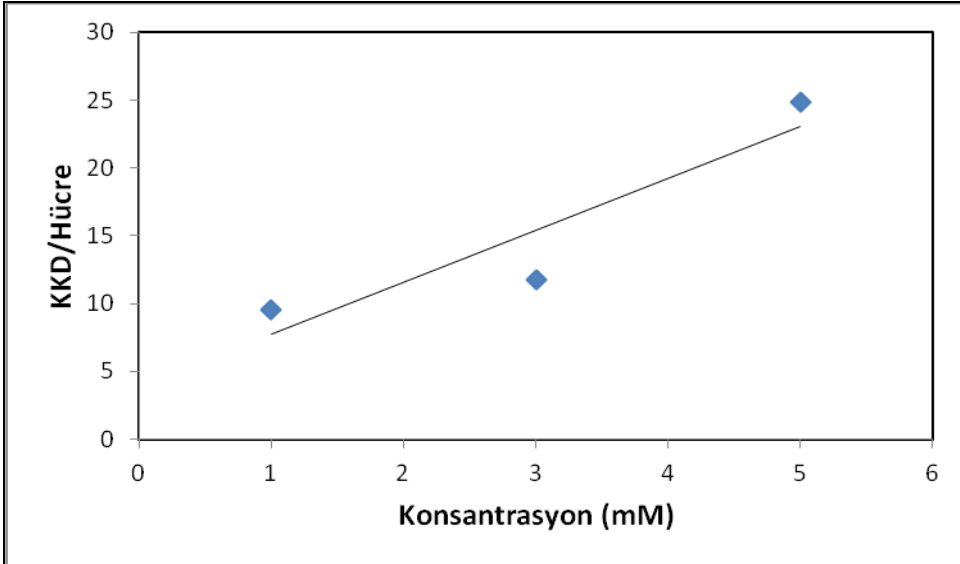
N: Toplam incelenen birey sayısı

a: Kontrol ile; **b:** Eritici (Negatif) Kontrol (DMSO) ile; **c:** Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark $p < 0,05$ derecesinde önemlidir.

* Yüksek Konsantrasyon nedeniyle bölünme az olduğu için; üç donörde 40'ar hücre sayılmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise donör başına 50'şer hücre sayılmıştır.



Şekil 6.1. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KGD)



Şekil 6.2. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimlerinin (KGD) konsantrasyona bağlı artışını gösteren eğim çizgisi

6.2.2. Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkiler

PERC'in farklı konsantrasyonları (1mM, 3mM ve 5mM) ile 48 saatlik muamele edilen insan lenfosit kültürlerinde 3 donörde gözlenen total KA değerleri Çizelge 6.5'de verilmiştir. Çizelgede; çalışmada gözlenen kromozomal anormallik (kromatid ve kromozom tipte) taşıyan hücrelerin yüzdesi gösterilmiştir.

KA test yönteminde, deneysel birim hücredir. Dolayısı ile anormallik taşıyan hücrelerin oranları hesaplanarak PERC'in klastojenitesi değerlendirilmiştir. Her bir konsantrasyon ve muamele süresi için iyi dağılmış 100 metafaz sayılmıştır. Ancak PERC'in 5mM konsantrasyonunda hücre bölünmesinin yeterince olmaması nedeni ile, her bir kişi için sadece 40 iyi dağılmış metafaz hücresi sayılabilmektedir.

Kromozomlarda despiralizasyon bölgeleri olarak düşünülen gaplar, kromozom aberasyonları olarak kabul edilmemekle beraber, bir anormallik sonucu ortaya çıkmış yapılardır. Bu nedenle, tablolarda gaplara sahip hücreler istatistiksel olarak değerlendirilmeye alınmamıştır.

Tüm donörlerden elde edilen sonuçlar total olarak değerlendirildiğinde (Çizelge 6.5, Şekil 6.3) 48 saatlik muameleli gruplarda PERC'in farklı konsantrasyonlarının uygulanması sonucu anormal hücre yüzdesinde kontrol grubuna göre artış olduğu gözlenmiştir ve aradaki fark $p < 0,05$ seviyesinde anlamlı iken, pozitif kontrol olan MMC ile karşılaştırıldığında ise, bu farklılığın sadece 5mM konsantrasyondaki PERC'de anlamlı olduğu görülmektedir. 48 saat muameleli gruplarda gözlenen sonuçlara göre, doz-cevap eğrisi Şekil 6.4'de gösterilmiştir.

Deneysel birim olarak hücreyi kabul ettiğimiz ve KA frekansını değerlendirdiğimizden dolayı, total veriler de düşük sayıda da olsa kromozom kırıklarına neden olmasından dolayı PERC'in klastojenik olduğu saptanmıştır.

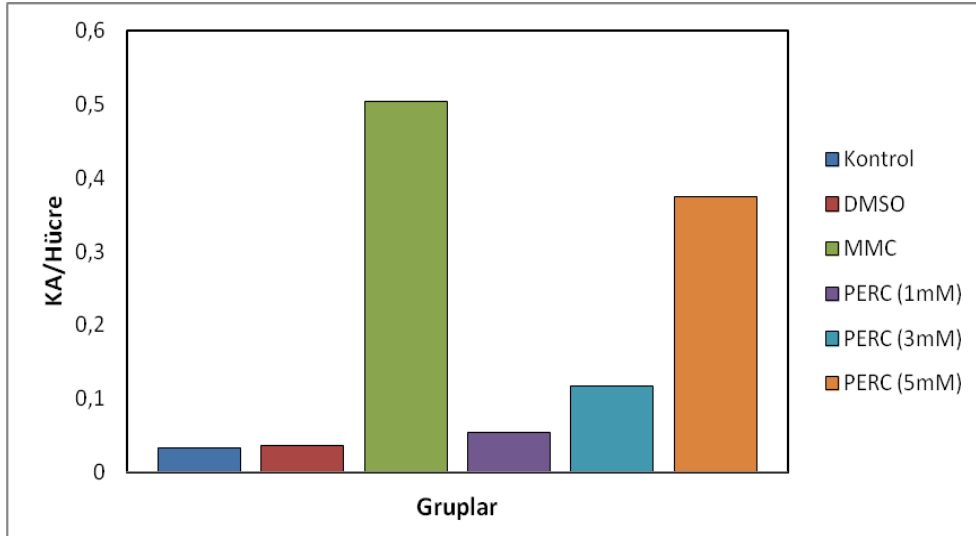
Çizelge 6.5. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total kromozom aberasyonları (KA)

Grup	N	Konsant.	Kromozomal Anormali		Toplam KA	KA/Hücre ± SH
			Kromatid Tipi	Kromozom Tipi		
Kontrol	3	-	8	2	10	0.033±0.003
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4 µl/ml	9	2	11	0.037±0.009
MMC (Pozitif kontrol)	3	0.2 µg/ml	100	51	151	0.503±0.043
PERC ile muamele	3	1mM	13	3	16	0.053±0.009 c
	3	3mM	26	9	35	0.117±0.009 abc
	3	5mM*	35	10	45	0.375±0.038 ab

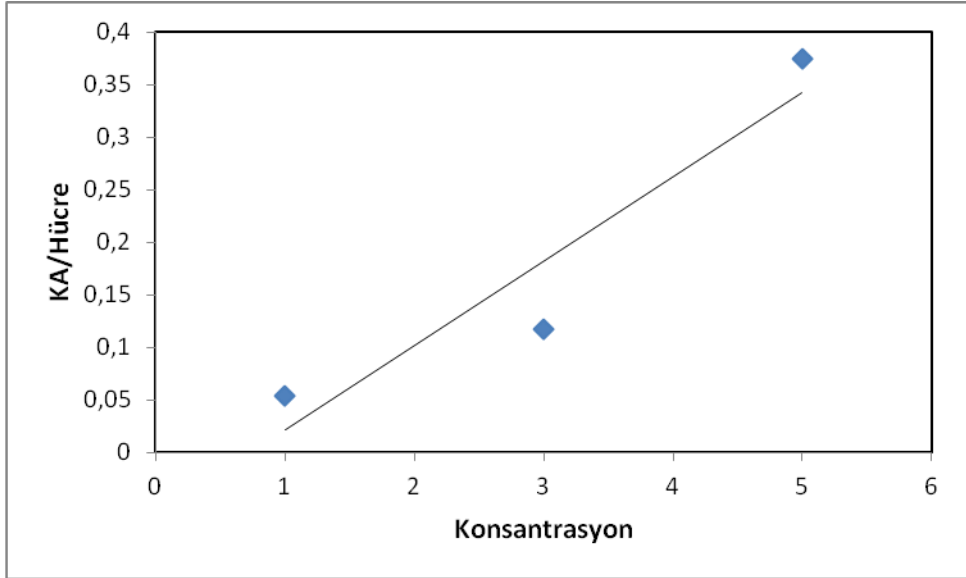
N: Toplam incelenen birey sayısı

a: Kontrol ile; **b:** Eritici (Negatif) Kontrol ile; **c:** Pozitif Kontrol ile aradaki fark $p < 0,05$ derecesinde önemlidir.

* Yüksek konsantrasyon nedeniyle bölünme az olduğu için; üç donörde 40'ar hücre sayılmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise donör başına 100'er hücre sayılmıştır.



Şekil 6.3. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total kromozom aberasyonları (KA)



Şekil 6.4. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total kromozom aberasyonlarının (KA) konsantrasyona bağlı artışını gösteren eğim çizgisi

6.2.3. DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkiler

PERC'in farklı konsantrasyonları (1mM, 3mM ve 5mM) ile 48 saatlik muamele edilen insan lenfosit kültürlerinde 3 donörde gözlenen Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI) değerleri Çizelge 6.6'de verilmiştir.

PERC'in 1mM, 3mM ve 5mM konsantrasyonlarının 48 saatlik muamelesinin RI'ni kontrole göre anlamlı olarak düşürdüğü görülmektedir (Çizelge 6.6). Pozitif kontrole göre ise, PERC'in 3mM ve 5 mM konsantrasyonlarındaki RI'ni $p < 0.05$ önemlilik derecesinde azalma olduğu görülmektedir. Şekil 6.5' ve Şekil 6.6' de 48 saat muamele sonucu üç donörden elde edilen total RI değerleri grafik üzerinde gösterilmiştir.

KA test yönteminden elde edilen MI değerleri değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça MI ve RI değerleri azalmaktadır (Çizelge 6.6, Şekil 6.7). 48 saatlik muamele süresinde MI'de gözlenen azalma kontrol grubuna göre PERC'in 3mM ve 5 mM konsantrasyonlarında, pozitif kontrol olan MMC'nin değerine göre ise, sadece PERC'in 5mM konsantrasyondaki değeri istatistik açıdan anlamlı olduğu

görülmektedir. 48 saat muameleli gruplarda gözlenen sonuçlara göre, doz-cevap eğrisi Şekil. 6.8’da gösterilmiştir.

KKD testi sonuçlarına göre, PERC insan lenfosit kültüründe belirgin bir DNA üzerinde hasar yapmayarak; uygulanan tüm konsantrasyonlarda ortalama KKD/hücre frekansını kontrole göre anlamlı olarak azalttığı için muhtemel genotoksik bir ajan değildir ancak, replikasyon indeksi olan RI ve MI değerini kontrole göre anlamlı olarak düşürdüğü için sitotoksik etkili olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 6.6. PERC’in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total replikasyon indeksi (RI) ve mitotik indeks (MI) değerleri

Grup	N	Konsant	M ₁	M ₂	M ₃	RI ± SH	MI ± SH
Kontrol	3	-	53	94	153	2.33±0.059	4.64±0.067
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4 µl/ml	59	94	147	2.29±0.052	4.62±0.055
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2 µg/ml	109	155	36	1.76±0.007	2.79±0.102
PERC ile muamele	3	1mM	105	126	69	1.88±0.02 abc	4.57±0.127 c
	3	3mM	97	147	56	1.86±0.084 ab	4.17±0.041 abc
	3	5mM*	92	116	49	1.79±0.087 ab	2.92±0.116 ab

N: Toplam incelenen birey sayısı

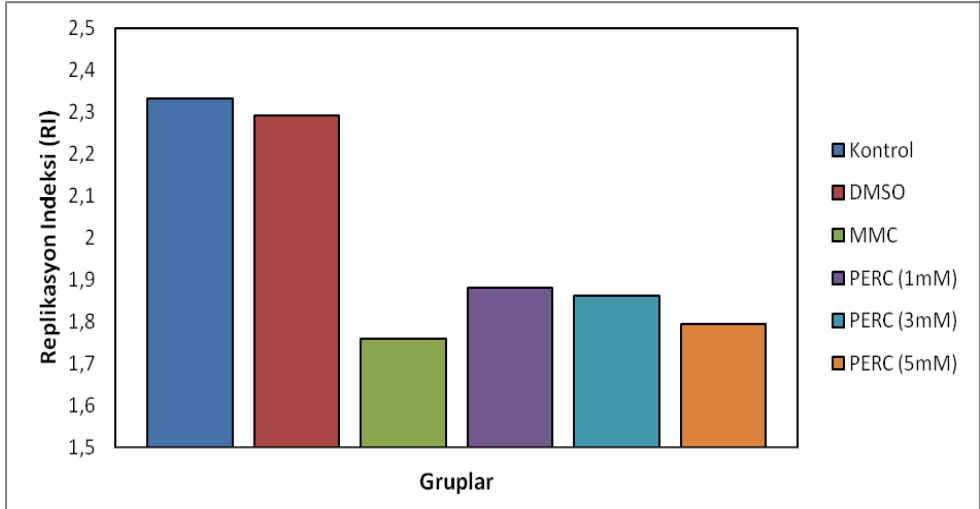
M1: Birinci mitoz bölünmesi

M2: İkinci mitoz bölünmesi

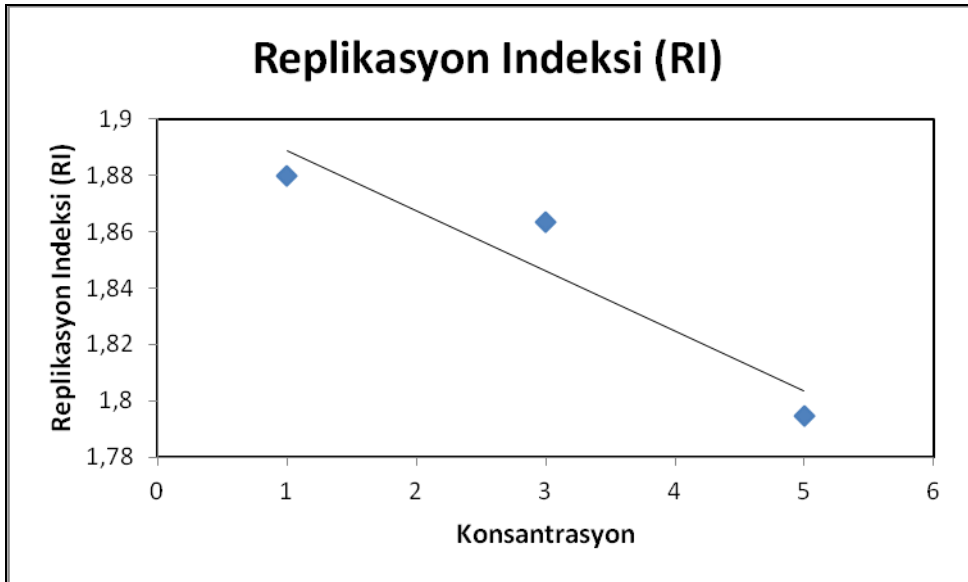
M3: Üçüncü mitoz bölünmesi

a: Kontrol ile; **b:** Eritici (Negatif) Kontrol ile; **c:** Pozitif Kontrol ile aradaki fark p<0,05 derecesinde önemlidir.

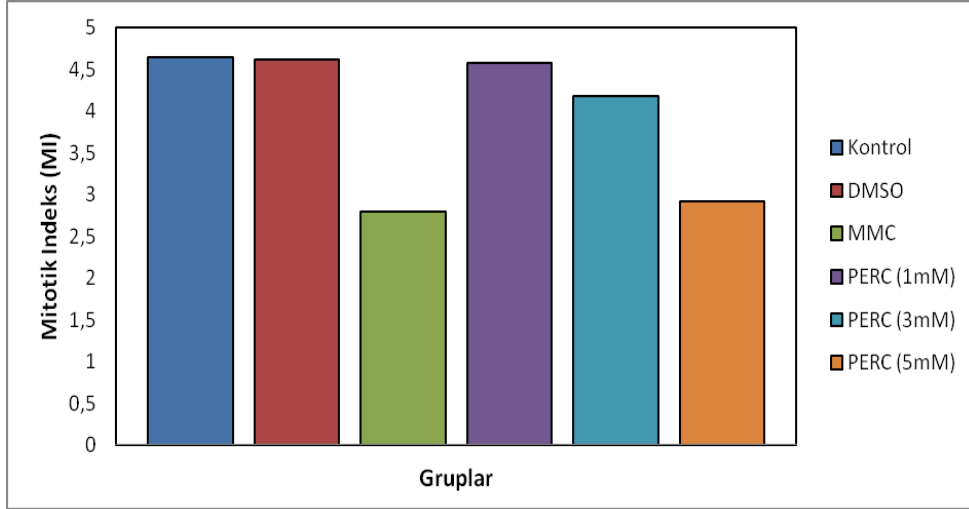
* Yüksek konsantrasyon nedeniyle bölünme az olduğu için; üç donörde MI için 400'er hücre sayılmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise donör başına 1000'er hücre sayılmıştır.



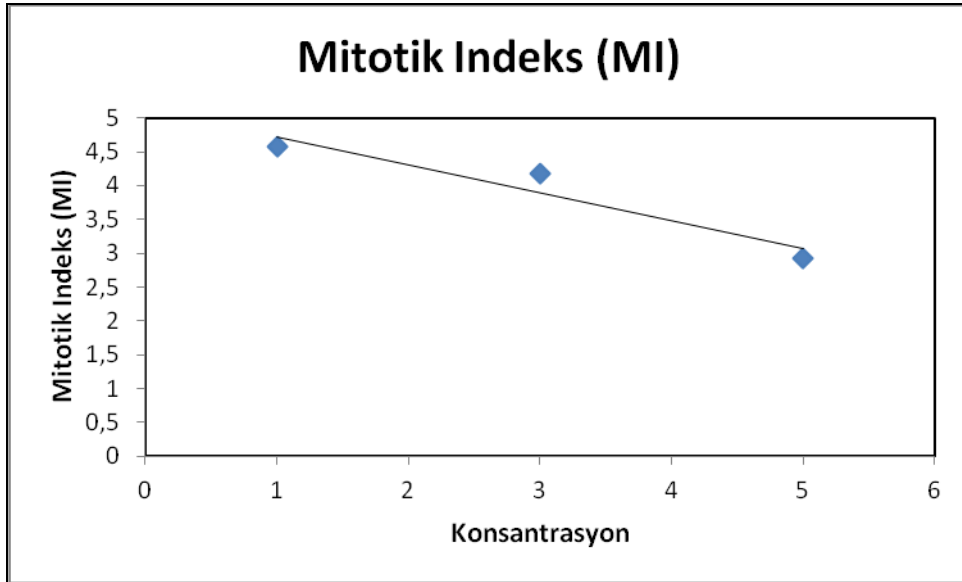
Şekil 6.5. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe gözlenen total replikasyon indeksi (RI) değerleri



Şekil 6.6. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferik lenfosit kültüründe gözlenen total replikasyon indeksinin (RI) konsantrasyona bağlı azalma gösteren eğim çizgisi



Şekil 6.7. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total mitotik indeks (MI) değerleri



Şekil 6.8. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen total mitotik indeks (MI) değerlerinde konsantrasyona bağlı azalma gösteren eğim çizgisi

6.2.4. Mikronukleus (MN) Üzerindeki Etkiler

İnsan lenfosit kültürlerinin PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmesi sonucu üç donorda gözlenen total MN sayısı Çizelge 6.7'da verilmiştir. MN test yönteminde mikronukleus taşıyan iki nukleuslu hücrelerin (BNMN) % oranları analiz edilerek genotoksisite değerlendirmesi yapılmıştır. Her bir konsantrasyon ve muamele süresi için 1000 iki nukleuslu hücre sayılarak kontrole göre anlamlılığı test edilmiştir.

Üç donörden elde edilen total verilere göre, MN sayısında 48 saat muamele süresinde kontrol ve eritici kontrole göre anlamlı artış görülmektedir (Çizelge 6.7). 48 saat muamele sonucu konsantrasyon arttıkça %MN frekansının da arttığı görülmektedir. PERC muamelesi sonucu her ne kadar %MN frekansında artış olsa da, bu durum pozitif kontrololan MMC ile karşılaştırıldığında bu artışın anlamlı olduğu sadece 5mM konsantrasyondaki değerde görülmektedir (Çizelge 6.7 ve Şekil 6.9). 48 saat muameleli gruplarda gözlenen sonuçlara göre, doz-cevap eğrisi Şekil. 6.10'de gösterilmiştir.

MN test sonuçlarına göre, KA test yönteminden elde edilen MI değerlerini kontrollere göre inhibe eden toksik konsantrasyon olan 5 mM PERC konsantrasyonu, MN test yönteminde de %MN frekansını 48 saat muamele süresinde kontrole göre anlamlı derecede arttırdığı için genotoksik etkili; bölünme indeksi olan RI değerlerini anlamlı olarak düşürdüğü için de test edilen PERC sitotoksik etkilidir.

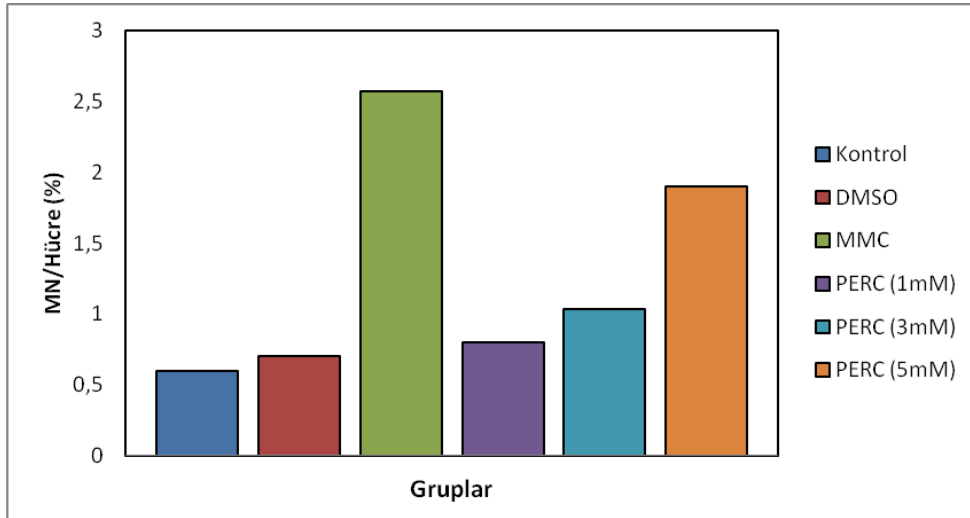
Çizelge 6.7. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen % MN değerleri

Grup	N	Konsantrasyon	MN/Hücre (%) ± SH
Kontrol	3	-	0.60±0.100
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4µl/ml	0.70±0.057
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2µg/ml	2.57±0.240
PERC ile muamele	3	1mM	0.80±0.057c
	3	3mM	1.03±0.088abc
	3	5mM*	1.90±0.115ab

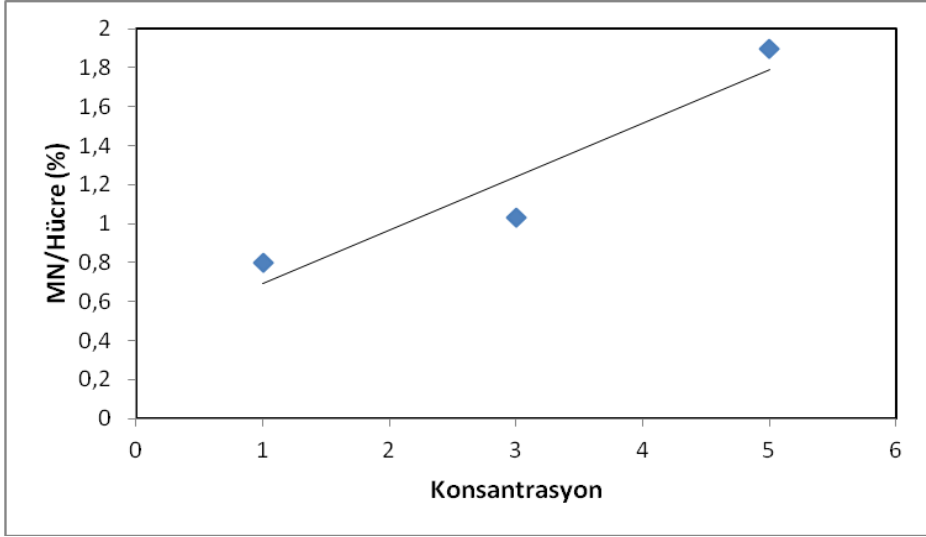
N: Toplam incelenen birey sayısı

a: Kontrol ile; **b:** Eritici (Negatif) Kontrol ile; **c:** Pozitif Kontrol ile aradaki fark $p < 0,05$ derecesinde önemlidir.

* Yüksek konsantrasyon nedeniyle bölünme az olduğu için; üç donörde %MN için 300'er hücre sayılmıştır. Diğer konsantrasyonlarda ise donör başına 1000'er hücre sayılmıştır.



Şekil 6.9. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen % MN değerleri



Şekil 6.10. PERC'in farklı konsantrasyonları ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfosit kültüründe üç donörde gözlenen % MN değerlerinde konsantrasyona bağlı azalma gösteren eğim çizgisi

6.3. Perkloretilen (PERC)'in Kuru Temizleme Çalışanları Periferal Kan Lenfositlerindeki in vitro Genotoksik Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışma için kullanılan kan örnekleri, Aydın Bölgesi'nde bulunan kuru temizleme işyerlerinde çalışan 10 erkek ve sigara ve herhangi bir ilaç kullanmayan sağlıklı 10 erkek bireyden alınmıştır. Negatif (eritici) kontrol için hücre kültürlerine 4 µl/ml'lik DMSO, pozitif kontrol için ise, hücre kültürlerine ise 0.2 µg/ml'lik mitomisin-C (MMC) eklenmiştir.

6.3.1. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkiler

PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarından ve herhangi bir kimyasala maruz kalmayan sağlıklı kişilerden alınan periferal kan örnekleri değerlendirildiğinde; kuru temizleme çalışanlarının periferal kanlarındaki KKD frekansı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında KKD/hücre sayısında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 6.8 ve Şekil 6.11). PERC'e maruz kalma KKD'yi genel olarak hem kontrol hem de eritici kontrole göre arttırırken, pozitif kontrole göre bir artış söz konusu değildir. Kardeş kromatid değişimindeki bu artış sadece eritici kontrole göre istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Muameleli

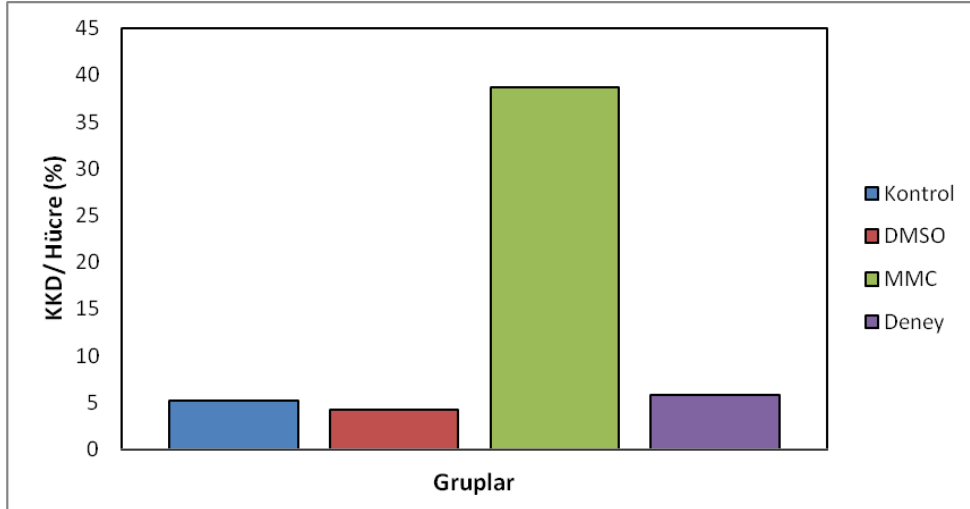
kültürlerdeki KKD sayısı pozitif kontrolden önemli derecede düşüktür (Çizelge 6.8). Yani PERC'e maruz kalma KKD'ni pozitif kontrol olan MMC kadar uyarılmamıştır.

Çizelge 6.8. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD)

Grup	N	Konsantrasyon	Min – Max KKD	KKD/Hücre ± SH
Kontrol	10	-	2-14	5.18±0.313
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4 µl/ml	2-14	4.23±0.173
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2 µg/ml	7-66	38.71±4.716
Kuru Temizlemede çalışanlar	10	-	4-16	5.85±0.263bc

N: Toplam incelenen birey sayısı

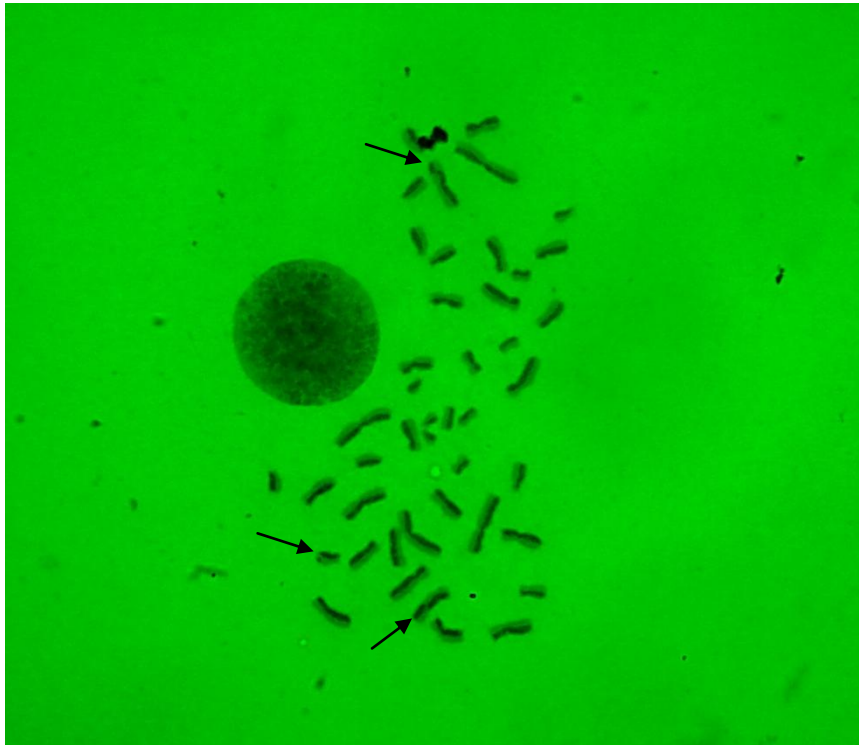
a: Kontrol ile; **b:** Eritici Kontrol (DMSO) ile; **c:** Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark $p<0,05$ derecesinde önemlidir.



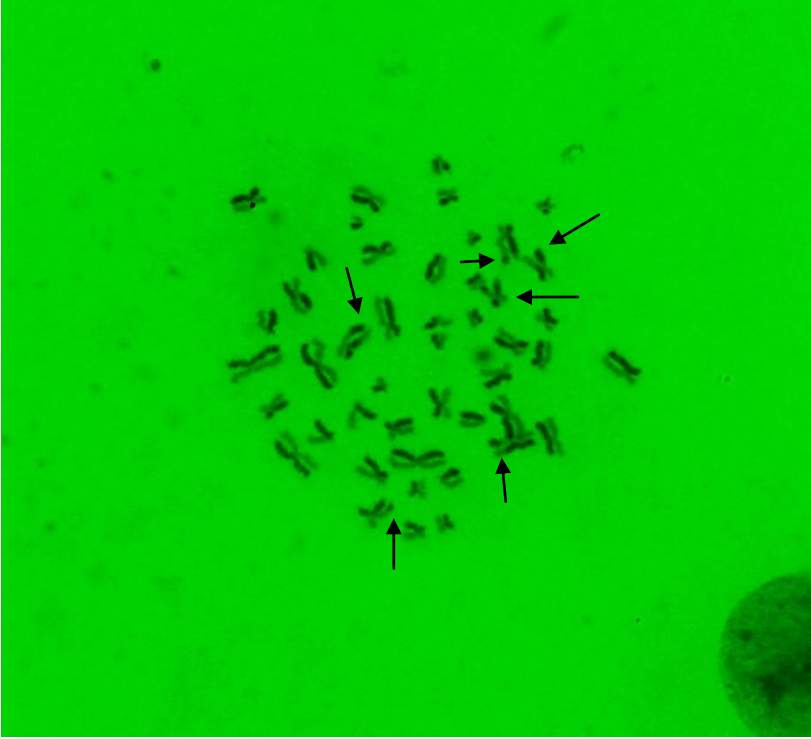
Şekil 6.11. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama kardeş kromatid değişimleri (KKD)

KKD test yöntemi sonucu PERC'e maruz kalmış ve kalmamış olan negatif kontrol grubu ve PERC'E maruz kalmış kuru temizleme çalışanları insan periferel lenfosit kültüründe kardeş kromatid değişimleri (KKD) değişimlerine ait örnekler Şekil 6.12 ve Şekil 6.13'te yer almaktadır.

KKD testi sonuçlarına göre, PERC'e uzun süreli maruz kalmanın insan lenfosit kültüründe DNA üzerinde belirgin bir hasar yaparak, ortalama KKD/hücre frekansını kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı, ancak bu artışın pozitif kontrol kadar yüksek olmaması nedeni ile muhtemel genotoksik bir risk oluşturabileceği söylenebilir.



Şekil 6.12. Kontrol grubuna ait insan periferel lenfositlerinde indüklenmiş KKE'ler (X1000)



Şekil 6.13. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait insan periferel lenfositlerinde indüklenmiş KKA'lar (X1000)

6.3.2. Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkiler

KA, genellikle hücre bölünmesi sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanır. Kuru temizleme işyerlerinde uzun süreli PERC'e maruz kalan kişilerden alınan periferel kan örnekleri KA frekansı, hem kromozom tipi hemde kromatid tipi KA olarak saptanmıştır. KA hesaplayabilmek için, preparatlardan her bir kişi için 100 tane iyi dağılmış metafaz hücresi sayılmıştır. KA testinin analizinde KA içeren hücreler değil, hücre başına düşen KA sayıları değerlendirilerek, uzun süreli PERC'e maruz kalan kişilerin insan periferel kan lenfositlerinde oluşabilecek genotoksik etki değerlendirilmiştir.

Uzun süreli PERC'e maruz kalan kişilerin periferel kan lenfositlerinde KA değerinde, kontrol grubuna göre artış olduğu görülmüştür. Ancak ne kontrole göre nede eritici kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p < 0,05$ seviyesinde). PERC'e maruz kalma sonucunda oluşan yapısal kromozom

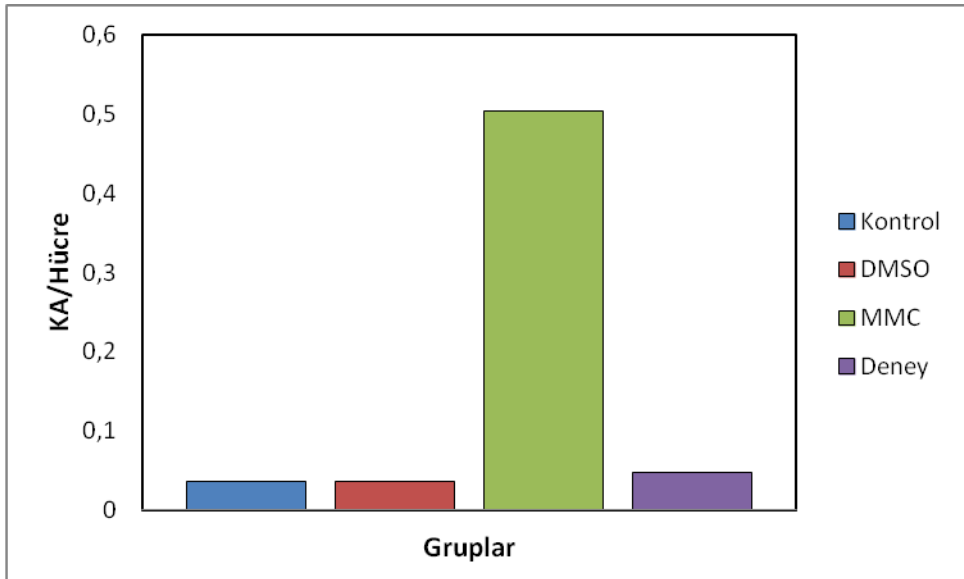
anormallikleri pozitif kontrol kadar uyarılmamıştır (Çizelge 6.9 ve Şekil 6.14). Toplam anormal hücre oranındaki artış da yapısal kromozom anormalliği içeren hücrelerin oranındaki artışa benzer durum göstermiştir.

Çizelge 6.9. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama KA değerleri

Grup	N	Konsant.	Kromozomal Anormali		Toplam KA	KA/Hücre ± SH
			Kromatid Tipi	Kromozom Tipi		
Kontrol	10	-	25	11	36	0.036±0.005
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4 µl/ml	9	2	11	0.037±0.009
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2 µg/ml	100	51	151	0.503±0.043
Kuru Temizleyici	10	-	37	11	48	0.048±0.004c

N: Toplam incelenen birey sayısı

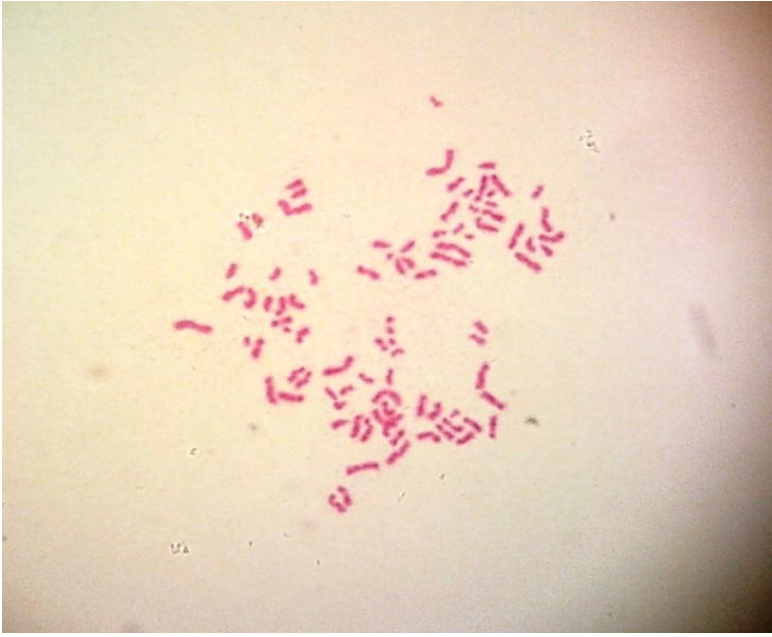
a: Kontrol ile; **b:** Eritici Kontrol (DMSO) ile; **c:** Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark $p<0,05$ derecesinde önemlidir.



Şekil 6.14. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferal lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama KA değerleri

KA test yöntemi sonucu direk PERC'e maruz bırakılmış ve PERC'e maruz kalmamış olan negatif kontrol grubu ve PERC'e maruz kalmış kuru temizleme çalışanları insan periferel lenfosit kültüründe kromozomal aberasyon (KA)'lara ait örnekler, Şekil 6.15, Şekil 6.16, Şekil 6.17 ve Şekil 6.18'te yer almaktadır.

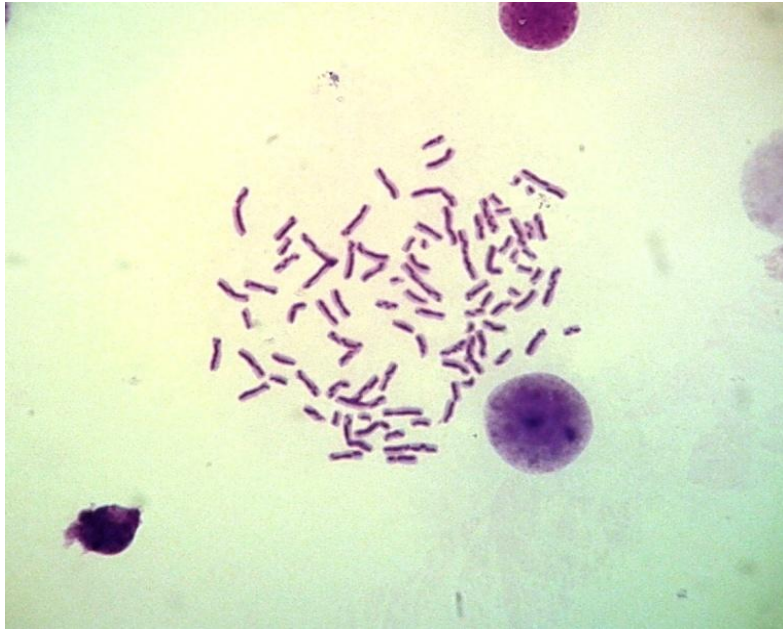
Deneysel birim olarak hücreyi kabul ettiğimiz ve KA frekansını değerlendirdiğimizden dolayı, total veriler de düşük sayıda da olsa kromozom kırıklarına neden olmasından dolayı PERC'e uzun süreli maruz kalma sonucunda klastojenik riskin ortaya çıkabileceği de saptanmıştır.



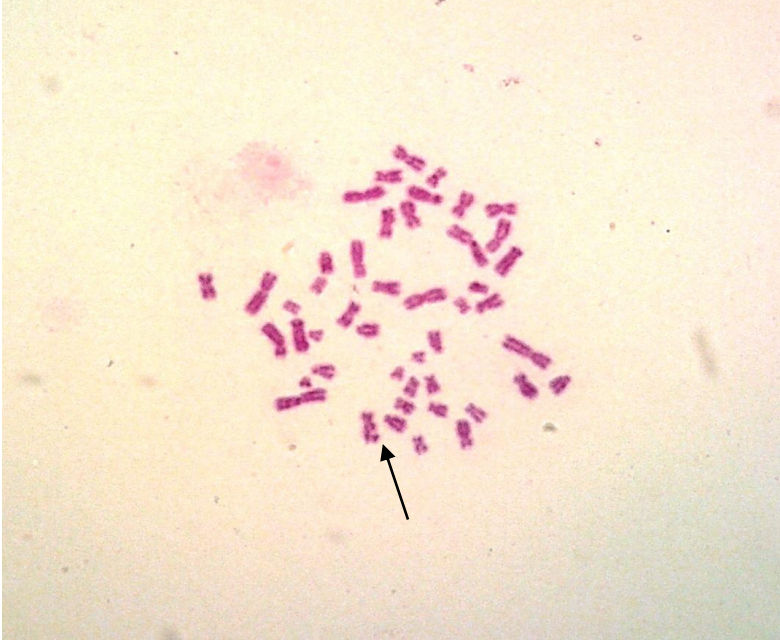
Şekil 6.15. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait erken kromatid ayrılması (X1000)



Şekil 6.16. PERC'e direk maruz kalmış (3mM) bireylere ait kromozom tipi kırılma (a) ve kardeş kromatid değişimi (b) (X1000)



Şekil 6.17. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait poliploidi (X1000)



Şekil 6.18. PERC'e direkt maruz kalmış (3mM) bireylere ait kromatid tipi kırılma (X1000)

6.3.3. DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkiler

Uzun süreli PERC'e maruz kalmanın DNA replikasyonu üzerindeki etkisi, replikasyon indeksinin (RI) saptanmasıyla, mitoz bölünme üzerindeki etkisi de mitotik indeksin (MI) saptanmasıyla belirlenmiştir. Proliferasyon indeksi (PI), DNA replikasyonu üzerine etkisini göstermektedir. RI hesaplayabilmek için, preparatlardan her bir kişi için 100 tane iyi dağılmış metafaz hücresi sayılmıştır.

Uzun süreli PERC'e maruz kalan ve kalmayan bireylerin lenfosit kültürlerinde toplam yirmi donörde gözlenen Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI) değerleri Çizelge 6.10'da verilmiştir.

Uzun süreli PERC'e maruz kalan kişilerin insan periferik kan lenfosit kültürlerinde RI, kontrol grubu ve eritici kontrole göre genel olarak benzer bulunmuştur. Kontrol ve eritici kontrol ile aradaki bu benzerlik istatistiksel olarak da önemsizdir (Çizelge 6.10). PERC'e maruz kalan bireylerin lenfosit kültürlerinde RI'si pozitif kontrolden yüksek bulunmuştur ve aradaki fark istatistiksel olarak önemli değildir. Bu durum, uzun süreli PERC'e maruz kalmanın DNA replikasyonunu pozitif

kontrol kadar olumsuz yönde etkilemediğini göstermiştir ($p<0,05$) (Çizelge 6.10 ve Şekil 19).

Kuru temizleme işyerlerinde uzun süreli PERC'e maruz kalmanın mitoz bölünme üzerindeki etkisi, mitotik indeksinin (MI) bulunması yoluyla saptanmıştır. MI hesaplayabilmek için, preparatlardan her bir kişi için 1000 tane iyi dağılmış metafaz hücresi sayılmıştır.

Uzun süreli PERC'e maruz kalmanın insan periferik lenfosit kültürlerinde MI hem kontrol grubu hem de eritici kontrole göre önemli derecede etkilemediği görülmüştür. Kontrol ve eritici kontrol ile aradaki bu fark istatistiksel olarak önemsizdir (Çizelge 6.10). Uzun süreli PERC'e maruz kalma sonucu insan periferik lenfosit kültürlerinde gözlenen MI, pozitif kontroldekinden yüksektir, ancak bu durum istatistiksel olarak da önemli değildir (Şekil 6.20).

Çizelge 6.10. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferik lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama Replikasyon İndeksi (RI) ve Mitotik İndeks (MI) değerleri

Grup	N	Konsant.	M ₁	M ₂	M ₃	RI ± SH	MI ± SH
Kontrol	10	-	180	407	413	2.23±0.057	4.94±0.145
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4 µl/ml	59	94	147	2.29±0.052	4.62±0.055
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2 µg/ml	109	155	36	1.76±0.007	2.79±0.102
Kuru Temizleyici	10	-	231	431	339	2.11±0.047c	4.74±0.157c

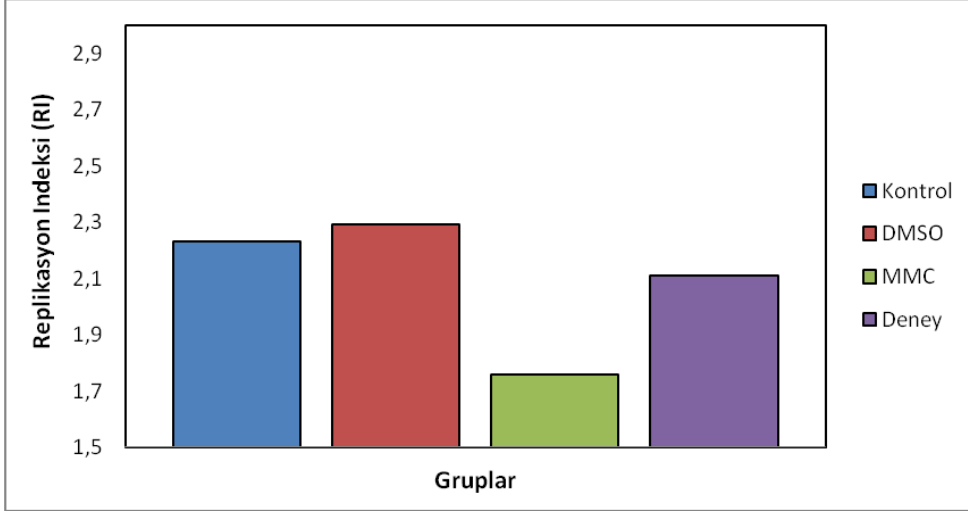
N: Toplam incelenen birey sayısı

M1: Birinci mitoz bölünmesi

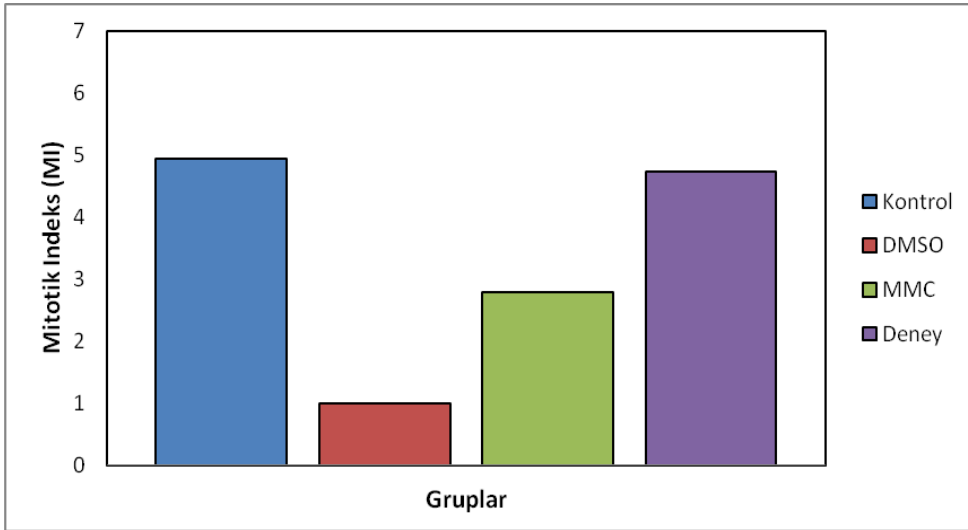
M2: İkinci mitoz bölünmesi

M3: Üçüncü mitoz bölünmesi

a: Kontrol ile; **b:** Eritici Kontrol (DMSO) ile; **c:** Pozitif Kontrol (MMC) ile aradaki fark $p<0,05$ derecesinde önemlidir.



Şekil 6.19. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferel lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama Replikasyon İndeksi (RI)



Şekil 6.20. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferel lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen Mitotik İndeks (MI) değerleri

Uzun süreli PERC'e maruz kalma sonucu periferel lenfosit kültürlerinde replikasyon indeksi olan RI ve MI değerini kontrole göre anlamlı olarak arttırmadığı için sitotoksik etki oluşturmadığı saptanmıştır.

6.3.4. Mikronukleus Oluşumu Üzerindeki Etkiler

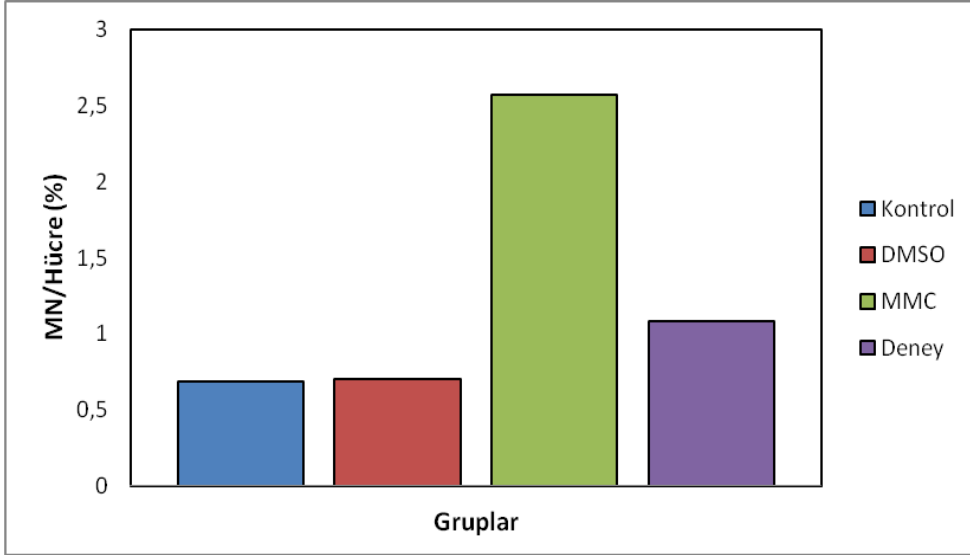
PERC'e uzun süreli maruz kalma sonucunda kuru temizleme çalışanlarının lenfosit kültürlerinde MN'lu hücre oranı (%) kontrol grubundaki bireylere nazaran yüksek bulunmuştur ve bu artış istatistiksel olarak da önemlidir ($p<0,05$) (Çizelge 6.11). Ancak PERC'e maruz kalmış grupların kültürlerdeki MN'lu hücre oranındaki artış pozitif kontrol kadar önemli derecede artış olmamıştır (Çizelge 6.11 ve Şekil 6.21).

Çizelge 6.11. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferik lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama MN (%) değeri

Grup	N	Konsantrasyon	MN/Hücre (%)±SH
Kontrol	10	-	0.69±0.050
DMSO (Eritici Kontrol)	3	4µl/ml	0.70±0.057
MMC (Pozitif Kontrol)	3	0.2 µg/ml	2.57±0.240
Kuru Temizleyici	10	-	1.08±0.076 abc

N: Toplam incelenen birey sayısı

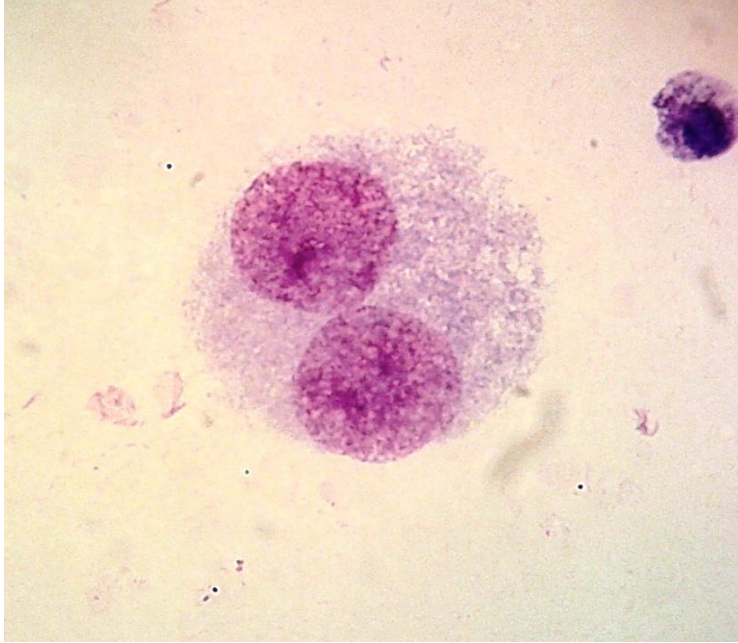
a: Kontrol ile; **b:** Eritici Kontrol (DMSO) ile; **c:** Pozitif Kontrol (MMC) ile arasındaki fark $p<0,05$ derecesinde önemlidir.



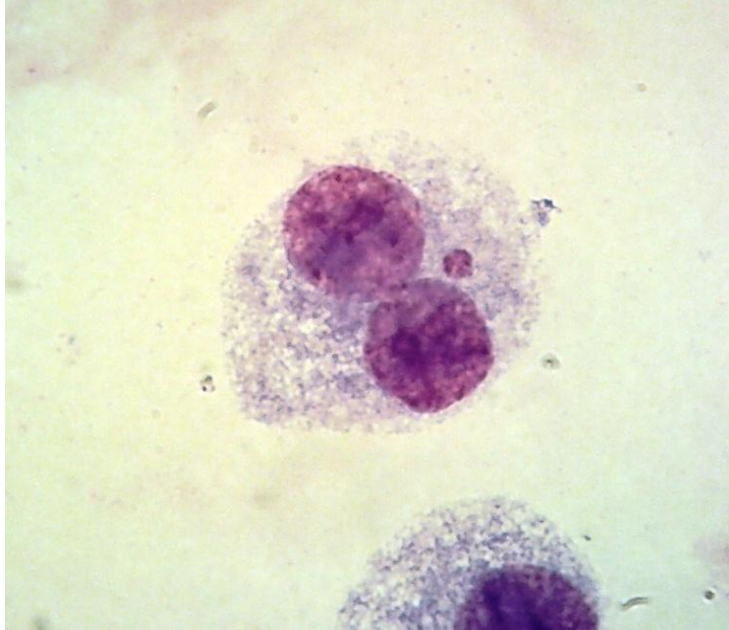
Şekil 6.21. PERC'e maruz kalmış ve kalmamış insan periferel lenfosit kültüründe toplam yirmi donörde gözlenen ortalama MN (%) değeri

MN gözlemleri sonucu kontrol ve kuru temizleme çalışanları lenfosit kültürlerinde gözlenen binukleuslu hücre ve mikronukleuslu hücelere ait örnekler de Şekil 6.22, Şekil 6.23 ve Şekil 6.24'de yer almaktadır.

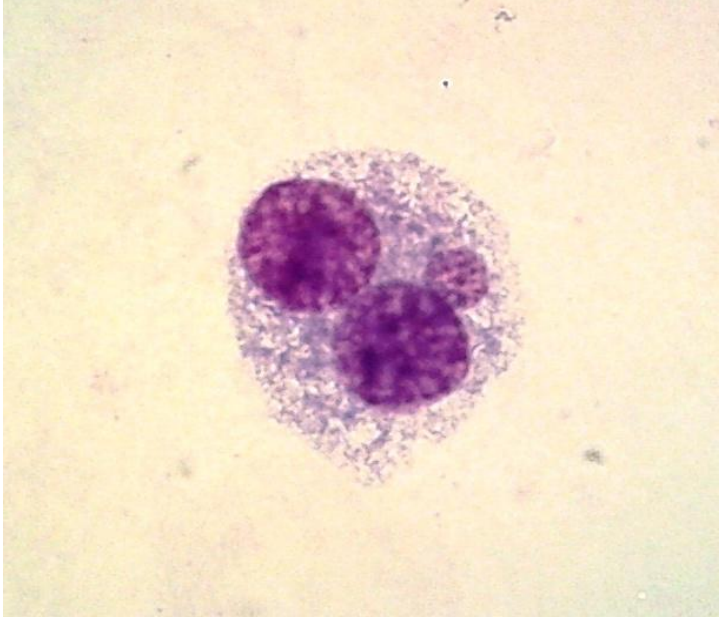
PERC'e uzun süreli maruz kalma sonucunda kuru temizleme çalışanlarının lenfosit kültürlerinde MN'lu hücre oranını (%) kontrole göre anlamlı derecede arttırması, ancak bu artışın pozitif kontrol kadar yüksek olmaması nedeni ile; PERC'e uzun süre maruz kalmanın genotoksik risk oluşturabileceği sonucuna varılabilir.



Şekil 6.22. Kontrol grubuna ait binukleuslu hücre (X1000)



Şekil 6.23. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait mikronukleus içeren binukleuslu hücre (X1000)



Şekil 6.24. PERC'e maruz kalan kuru temizleme çalışanlarına ait büyük mikronukleus içeren binukleuslu hücre (X1000)

7. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışma Aydın Bölgesi'nde bulunan kuru temizleme işyerlerinde çalışan bireylerin uzun süreli perkloroetilen (PERC)'e maruz kalmaları sonucunda insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliklerini (KA), kardeş kromatid değişimini (KKD=SCE), iki nükleuslu hücrelerde mikronükleus oluşumunu (MN) artırıp artırmadığını araştırmak ve bu testlerin yardımı ile insanlarda herhangi bir *in vitro* genotoksik etkiye sahip olup olmadığını saptamak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca saf haldeki perkloroetilenin sitotoksik etkisinin olup olmadığı da Brine Shrimp (*Artemia salina*) letality Assay ile araştırılmış, çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla tartışılmıştır.

Toksik maddelerin *in-vivo* olarak *Artemia salina* larvalarına olan öldürücü etkisi, hızlı ve basit bir yöntem olarak "Brine-Shrimp Lethality Assay"ın kullanılmasına olanak sağlamaktadır (Choudhary ve Thomsen, 2001). Bu test, toksisitenin öngörülmesi açısından kullanışlı bir testtir. *Artemia salina* ile yapılan Brine Shrimp Letality Assay'ın modifiye edilmiş şekli ile alınan sonuçlar, memeli hücre kültürleri ile yapılan toksisite testlerinden alınan sonuçlarla karşılaştırıldığında birbiriyile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Lewan vd., 1992).

Bu bilgiler ışığında bu çalışmada Brine Shrimp (*Artemia salina*) Letality Assay denemesinden elde edilen veriler incelendiğinde, PERC'in kullanılan konsantrasyon aralığında (10, 100, ve 1000 ppm) LC₅₀ değerlerine ulaşmadığı görülmüş, PERC'in denemede kullanılan konsantrasyonları hemen hemen kontrol ile aynı değerleri vermiş (sırası ile; kontrol: %6.66, PERC 10 ppm: %6.33, PERC 100 ppm: %5.33, PERC 1000 ppm % 4.33 ve etanol: %6.33) ve bu değerlerin de istatistik olarak anlamlı sonuçlar ortaya koymadığı saptanmıştır (p>0.05). Elde edilen veriler PERC'in 100µg/ml–1000µg/ml arasında bulunan LD₅₀ değerlerinin alt ve üst güvenlik sınırları itibarıyla toksisite sınırları içerisinde yer aldığını, bu konsantrasyon aralıkları içinde PERC'in *Artemia salina* larvaları için, toksik olmadığını ortaya koymuştur (Çizelge 6.2). Perkloroetilenin sitotoksik etkinliği ile ilgili bu tarz bir çalışma olmadığı için, elde edilen veriler literatür ile karşılaştırılamamıştır.

Kuru temizleme işyerlerinde uzun süreli PERC'e maruz kalmanın olası genotoksik etkilerini ortaya koyabilmek amacı ile çalışma iki aşamada yapılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında tek başına periferik lenfositlere 48 saat süreyle uygulanan PERC'in

periferik lenfosit kültürlerinde ortaya çıkarabileceği olası genotoksik etkiler araştırılmıştır. KKD ve KA testleri, kimyasal maddelerin genotoksik risklerinin belirlenmesinde kullanılan en hassas kısa süreli testler arasında yer almaktadır (Perry vd., 1975; Carrano vd., 1978). Bu çalışmada PERC'in tüm konsantrasyonları (1mM, 3mM ve 5mM) 48 saat muamele sonucu, ortalama KKD/hücre sayısında hem kontrole hem de eritici (negatif) kontrole göre anlamlı artışa neden olmuştur. Bu artış, konsantrasyon artışına bağlı olarak ortaya çıkmıştır. Ancak, PERC muamelesi sonucu görülen bu artış, pozitif kontrol olan MMC'de görülen KKD/hücre sayısı (38.71 ± 4.716) ile karşılaştırıldığında anlamlı bulunmamıştır.

Daha önce yapılan bazı çalışmalarda PERC'in genotoksik aktivitesi bakteri, maya ve memeli hücreleri gibi *in vitro* assay sistemlerinde çalışılmıştır (U.S. EPA, 1985, 1991; IARC, 1995; ATSDR, 1997). PERC'in, *in vitro* muameleyi takiben farklı hücrelerde mikronukleus ve kardeş kromatid değişimine (SCEs), tümör dokularında DNA'ya ve SSBs'ye bağlanma gibi bazı genotoksik etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Muzzullo (1987), PERC'in fare karaciğer ve sıçan böbreğinde DNA'ya bağlandığını bulmuştur. 5 mM (~830 mg/L) tetrakloretilen (TCE)'in, insan kan kültürlerinde kardeş kromatid değişimlerine (SCE) neden olduğu ve hücre canlılığını % 40 oranında azalttığını rapor edilmiştir (Hartmann ve Speit, 1995). Görüldüğü gibi bizim çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, başka araştırmacıların sonuçlarına benzemekte ve genel olarak nükleosid analogları gibi davranan PERC, KKD'yi uyarmaktadır.

48 saat PERC ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde yapısal kromozom anormalliklerinin sayısında kontrol grubuna göre konsantrasyona bağlı bir artış olduğu ancak aradaki farkın $p < 0,05$ seviyesinde anlamlı olmadığı; pozitif kontrol ile arasında gözlenen farklılığın ise anlamlı olduğu görülmüştür. Deneysel birim olarak hücreyi kabul ettiğimiz ve KA frekansını değerlendirdiğimizden dolayı, total verilerde düşük sayıda da olsa kromozom kırıklarına neden olmasından dolayı PERC'in klastojenik olduğu saptanmıştır. Tucker vd. (1993) ökaryotik hücrelerde KKD frekansının, DNA replikasyonu ile etkileşime girerek DNA hasarını indükleyen genotoksik ajanların etkisi ile arttığını bildirmişlerdir.

Mutajenik ajanlara maruz kalan insan popülasyonlarını izlemek için periferik kan lenfositlerinde, KA ve MN'lar kullanılmaktadır. KA test yönteminden elde edilen MI değerleri değerlendirildiğinde, konsantrasyon arttıkça MI ve RI değerleri de

azaldığı görülmüştür. 48 saatlik muamele süresinde MI'de gözlenen azalma pozitif kontrol olan MMC'nin değerinden bile fazla olmuştur ve bu durum istatistiki açıdan da anlamlı bulunmuştur. KKD testi sonuçlarına göre, PERC insan lenfosit kültüründe belirgin bir DNA üzerinde hasar yapmayarak, tüm konsantrasyonlarda ortalama KKD/hücre frekansını kontrole göre anlamlı olarak azalttığı için muhtemel genotoksik bir ajan değildir ancak, replikasyon indeksi olan RI ve MI değerini kontrole göre anlamlı olarak düşürdüğü için sitotoksik etkisi bulunmaktadır. Bu durumda, PERC'in DNA sentezini uygunsuz bir biçimde sonlandırdığını ve hücre bölünmesini baskı altına aldığı söylenebilir. PERC gibi etkisini DNA yapısına girerek yapan kimyasallar mitokondri DNA'sın olumsuz yönde etkileyebilmektedirler. Bunun sonucunda da hücre bölünmesi için gerekli enerji (ATP) üretimi bloke edilerek MI'in düştüğünü söyleyebiliriz. Nitekim Epel (1963) ve Jain ve Andsorbhoy (1988), hücrenin enerji üretim merkezinin baskılanması ve yeterli ATP'yi üretememesi sonucu MI'in düştüğünü bildirmişlerdir.

Çift iplik DNA kırıkları, asentrik fragmentli MN oluşumuna ve mitotik bölünmedeki hata, tam kromozomlu MN oluşumuna neden olmaktadır (Kirsch-Volders vd. 2003). In vitro KA deneylerinde MI indüklenen hücrel toksisiteyi izlemek için kullanılır. MI, hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini verir. Azalmış MI, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı gösterir. Amorim vd. 2000'de sitotoksikite derecesinin tespit edilmesinin, uygun preparasyon zamanını ve test konsantrasyonlarını seçmek için gerekli olduğunu ve özellikle sonuçların insanların maruz kalabileceği bileşiklerin risk değerlendirmesi için kullanıldığında önem taşıdığını bildirmişlerdir (Seligmann vd. 2003). 48 saat'lik PERC muamele süresinde MN sayısında kontrol ve eritici kontrole göre anlamlı artış olduğu görülmüştür. 48 saat muamele sonucu konsantrasyon arttıkça %MN frekansının da artmıştır. PERC muamelesi sonucu her ne kadar %MN frekansında artış olsa da, bu durum pozitif kontrol olan MMC ile karşılaştırıldığında bu artışın anlamlı olmadığı bulunmuştur. Ancak, PERC'in , %MN frekansını 48 saat muamele süresinde kontrole göre anlamlı derecede arttırdığı için genotoksik etkisinin olduğu söylenebilir. Aynı zamanda çalışmamız sonuçlarına göre %MN sayısı PERC'e maruz kalan bireylerde negatif kontrole göre anlamlı artış gösterirken, KKD sayısında böyle bir ilişki görülmemektedir. Bu çalışmada insan periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşumunun uyarılmasının PERC'in genel olarak klastojenik etkisinden kaynaklandığını

söyleyebiliriz. Zira PERC, yapısal kromozom aberasyonlarının da uyarıcıdır. Bu durum, klastojenik ve aneujenik nedenli MN oluşumu ile KKD'lerin oluşumunun farklı mekanizmalar tarafından meydana gelmesinden kaynaklanmış olabilir. Sonuç olarak, bu çalışmanın verilerine göre PERC'in lenfosit kültüründe doza bağlı artış olmasından kaynaklı DNA metabolizması ile etkileşime girdiğini, böylece KKD'yi indüklediğini bundan dolayı genotoksik risk taşıdığını göstermektedir.

Fenech'in göre (1997); KKD ve MN testlerinde elde edilen PI ve CBPI ortalama değerleri hücre siklusu kinetiğinin ölçülmesini sağlamakta ve bu ölçümler belli kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik etkileri hakkında önemli verileri yansıtmaktadır (Laffon vd. 2001). İndekslerdeki anlamlı azalma, yeni bir DNA replikasyon prosesi başlamadan önce indüklenen genotoksik hasarı onarmak üzere onarım sistemlerine izin veren hücre siklusu gecikmesini göstermektedir (Laffon vd. 2001). Wallis (1986), farelere intraperitoneal (i.p) yolla 4–8 mmol/kg (663–1326 mg/kg) PERC uyguladıktan 1 saat sonra, farelerin karaciğer ve böbrek dokularında artan seviyelerde tek iplikli DNA zincir kırıklarının olduğunu ancak akciğer dokularında bu tür bir hasara rastlanmadığını bildirmiştir. Potter vd. (1996), erkek F344 sıçanları 1.000 mg/kg perkloroetileni tek bir gavaj (sonda) ile muamele ettikten sonra, farelerin böbreklerdeki DNA zincirinde kırılmalarında herhangi bir artış olmadığını bulmuşlardır. Ancak, türler veya maruz kalınan dozlar arasındaki farklılıkları karşılaştıracak bu çalışmaları doğrudan karşılaştıracak çalışmalar bulunmamaktadır. Bu bulguların aksine in vitro olarak PERC'e maruz bırakılan Chinese hamster yumurtalık hücrelerinde SCE veya kromozom hasarlarına rastlanılmamıştır (Galloway vd., 1987). PERC ile yapılan in vitro mutasyon denemeleri (Ames test) veya DNA bağlanma denemeleri sonuçları, GSH metabolitlerinin üretildiği koşulların birkaçı hariç büyük ölçüde negatif olmuştur. PERC'in yüksek dozlarına (maruz kalma seviyesi belirlenmemiştir) akut olarak maruz kalma sonucunda hepatomegali, karaciğer hücrelerinde hasarlar, birkaç karaciğer enziminde yükselme, bilirubin parçalanması gibi hepatotoksik etkilerin de ortaya çıktığı gözlenmiştir (Coler ve Rossmiller, 1953; Stewart vd., 1961; Meckler ve Phelps, 1966; Saland, 1967; Hake ve Stewart, 1977; ATSDR, 1997).

Brine Shrimp Letality Assay sonuçların da perkloroetilenin tek başına uygulandığında, *Artemia salina* larvaları üzerine sitotoksik etkisinin olmadığını ortaya koymuştur.

Bu çalışmanın ikinci kısmında kuru PERC'e uzun süreli maruz kalan kuru temizleme çalışanlarından ve herhangi bir kimyasala maruz kalmayan sağlıklı kişilerden alınan toplam yirmi donörün periferik lenfosit kültürlerinde ortaya çıkarabilecek olası genotoksik etkiler araştırılmıştır.

Bu çalışmada PERC'e uzun süreli maruz kalan kuru temizleme çalışanlarının periferik kanlarındaki KKD testi sonuçları; PERC'e uzun süreli maruz kalmanın insan lenfosit kültüründe DNA üzerinde belirgin bir hasar yaparak, ortalama KKD/hücre frekansını kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı; ancak bu artışın pozitif kontrol kadar yüksek olmaması nedeni ile muhtemel genotoksik bir risk oluşturabileceğini göstermiştir. Yine deneysel birim olarak hücreyi kabul ettiğimizde ve KA frekansını değerlendirdiğimizde, total veriler düşük sayıda da olsa kromozom kırıklarına neden olmasından dolayı PERC'e uzun süreli maruz kalma sonucunda klastojenik riskin ortaya çıkabileceği de saptanmıştır.

Uzun süreli PERC'e maruz kalmanın, insan periferik lenfosit kültürlerindeki mitotik indeksi (MI) hem kontrol grubu hem de eritici kontrole göre önemli derecede etkilemediği görülmüştür. Kontrol ve eritici kontrol ile aradaki bu farkın istatistiksel olarak önemsiz olduğu, ancak PERC'e maruz kalan grubun MI değerleri pozitif kontroldekinden önemli derecede yüksek olmuş ve bu durum istatistiksel olarak da önem taşımaktadır. Bu durum değerlendirildiğinde; uzun süreli PERC'e maruz kalma sonucu periferik lenfosit kültürlerinde replikasyon indeksi olan RI ve MI değeri kontrollere göre anlamlı olarak artışı için, sitotoksik etki oluşturmadığı saptanmıştır.

Yine; PERC'e uzun süreli maruz kalmanın lenfosit kültürlerinde (%) MN'lu hücre oranını pozitif kontrol kadar anlamlı derecede arttırmamasına rağmen yine de kontrol ve eritici kontrole göre anlamlı derecede arttırması nedeni ile; PERC'e uzun süreli maruz kalmanın genotoksik risk oluşturabileceği sonucuna varılabilir. PERC'in kültüre edilen Chinese hamster karaciğer hücrelerinde (Wang vd., 2001) ve insan periferik kan hücrelerinde mikronukleuslara neden olduğu rapor edilmiştir (Doherty vd., 1996; White vd., 2001). Bizim çalışmamızın sonuçları da literatürde bildirilen sonuçlara uygunluk göstermektedir. Yine PERC ile muamele edilen insan lenfoblastosid hücrelerinde gözlenen mikronukleus oluşumunun, cDNA'yı kodlayan ya CYP2E1 (hE1 hücreleri) ya da insan CYP1A2, 2A6, 3A4, 2E1 ve mikrozomal epoksid hidrolazın stabil ekspresyonu nedeniyle ortaya çıkmış olabileceği de belirtilmiştir (Doherty vd., 1996).

Çalışmanın bu kısmından elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde; PERC'e uzun süre maruz kalan kuru temizleme çalışanlarının lenfosit kültüründe PERC'in DNA metabolizması ile etkileşime girmediğini, dolayısı ile KKD'leri indüklediğini bundan dolayı muhtemelen genotoksik olmadığını göstermektedir. Ancak PERC, MN oluşumunu indüklemektedir. Bunun nedeni PERC'in aneujenik etkisinden kaynaklanabilir ki bunun araştırılması gerekmektedir. Ayrıca uzun süreli PERC'e maruz kalma sonucunda PERC'in genotoksitesine karar verebilmek için diğer in vivo ve mutajenite testlerinin de yapılması gerekmektedir.

Dünyada ve Türkiye'de meydana gelen hızlı sanayileşme ve teknolojik gelişmeler ile doğru orantılı olarak özellikle iş yerlerinde çalışan kişilerin güvenliği ile ilgili bazı sorunlar da açığa çıkmaktadır. Bu sebeple bir takım önlemleri önceden alarak iş yerlerini güvenli hale getirmek gerekmekte olduğundan iş güvenliği oldukça önem kazanmıştır. Avrupa'da kuru temizleme endüstrisinde çalışan yaklaşık 1,5 milyonun üzerindeki işçi ortalama olarak 59 ppm ve uygulamaya bağlı olarak daha yüksek düzeyinde her yıl PERC'e maruz kalmaktadırlar. Ancak, Türkiye'de kuru temizlemede çalışan işçi sayısı ve maruz kalınan PERC miktarı kesin olarak bilinmediği için, ülkemizdeki işçilerin durumu hakkında kesin bir şey söylemek mümkün değildir. Kuru temizleme işleminde kullanılan PERC ve TCE'nin başlıca yemek borusu, rahim ağzı, rahim, mesane kanserleri ve Non-Hodgkin Lenfoma (lenf bezi kanseri) gibi kanser türlerine yol açtığı, bu merkezlerde çalışan kişilerde özellikle mesane ve rahim ağzında görülen kanser riskinin normal kişilere göre yaklaşık yüzde 45 oranında arttığı saptanmıştır. Bu açıdan bakıldığında kuru temizleme sektöründe çalışan kişilerin kanser ve benzeri hastalıklar yönünden risk altında buldukları bir gerçektir.

PERC'in tek başına uygulanması ve uzun süreli PERC'e maruz kalma sonucunda *Artemia salina* larvalarında ve insan periferik lenfositleri üzerinde oluşturduğu sitotoksik ve in vitro genotoksik etkilerinin olabileceği konusunda yapılan ilk çalışma sonuçları olması açısından önemlidir. Bu nedenle çalışmadan elde edilen veriler; kuru temizleme işyerleri gibi işyerlerinde çalışan bireylerin PERC gibi kimyasallara maruz kalmaları sonucunda istenmeyen çeşitli etkilerin ortaya çıkabileceği konusunda bilinçlendirilmesi konusunda bir yol gösterici olacaktır. Ayrıca araştırma sonuçlarımız; işyerlerinde çalışan işçilerin sağlığının ve iş güvenliğinin sağlanması, bir başka ifadeyle, işyerinde doğabilecek, iş kazası ve meslek hastalıkları gibi her türlü riske karşı gerekli tedbirlerin alınması ve bu

hususdaki şartların yerine getirilmesi, bu hedefleri yerine getirmeye yardımcı olabilecek araç-gereçlerin noksatsız bulundurulmasını gerektiren ve genelde bunların uygulanmasından işverenin sorumlu tutulduğu ve/fakat işçilerin de, öngörülen tedbirlerle ilgi olarak usul ve şartlara uymasını da yeniden hatırlatılması konusunda da önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Aardema, J.M., Kirsch-Volders, M., 2001. The in vitro micronucleus assay. In: Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment (Choy WN., Ed.), Marcel Dekker, pp. 163-86, New York.
- Akça, A., Çelik, A., Altunkan, Z., Taşdelen, B., Epözdemir, S., Birbiçer, H., Oral, U., 2007. Hücre bölünmesi ve kromozomlar üzerine etkileri. **Türk Anest Rean Der Dergisi**, 35(3):179-186.
- Altıntaş, N., Öreney, S., Aşçı, M., Reyhan, E., Türk, M., Yolasığmaz, A., Altıntaş, N., 2005. Karaciğer kist hidatiği tedavisinde albendazol kullanan hastalarda kardeş kromatid değişimi (SCE) çalışması. **Türk Parazitoloji Dergisi**, 29 (4): 235-237.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **International Programme on Chemical Safety**, 463(2): 111-72.
- Amorim, M.I., Mergler, D., Bahia, M.O., Dubeau, H., Miranda, D., Level, J., Burbano, R.R., Lucotte, M. 2000. Cytogenetic damage related to low levels of methyl mercury contamination in the Brazilian Amazon. **An. Acad. Bras. Cienc.**, 72: 487-507.
- Anonim, (27.11.2003). Kuru Temizleme Nasıl Yapılıyor? [<http://arsiv.ntvmsnbc.com/news/243243.asp>], Erişim Tarihi: 20.08.2011.
- Anonim, 2008. Artemia Kültürü. MEGEP (Meslekî Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi). T.C. Millî Eğitim Bakanlığı, Ankara.
- Anonim, 2009. Endüstriyel Ürünler Ansiklopedisi. Solver Kimya Yayınları, 791s., Adana.
- Aschengrau, A., Weinberg, J.M., Gallagher, L.G., Winter, M.R., Vieira, V.M., Webster, T.F., Ozonoff, D.M. 2009a. Exposure to tetrachloroethylene-contaminated drinking water and the risk of pregnancy loss. **Water Qual Expo Health**, 1: 23-34.
- Aschengrau, A., Weinberg, J.M., Janulewicz, P.A., Gallagher, L.G., Winter, M.R., Vieira, V.M., Webster, T.F., Ozonoff, D.M. 2009b. Prenatal exposure to tetrachloroethylene-contaminated drinking water and the risk of congenital anomalies: a retrospective cohort study. **Environmental Health**, 8:44.

- Aschengrau, A., Weinberg, J.M., Janulewicz, P.A., Romano, M.E., Gallagher, L.G., Winter, M.R., Martin, B.R., Vieira, V.M., Webster, T.F., White, R.F., Ozonoff, D.M. 2012. Occurrence of mental illness following prenatal and early childhood exposure to tetrachloroethylene (pce)-contaminated drinking water: a retrospective cohort study. **Environmental Health**, 11:2.
- Ataç, Ö., 2011. Kuru temizleme solventleri ve alternatifleri, makale, [<http://www.temizlikhaber.com/tr/post/hakkaride-cevre-temizligi-sorunu-123.html>], Erişim Tarihi: 10.08.2011.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1997. Toxicological profile for tetrachloroethylene. Springfield, VA.
- Barahona, M.V., Sacher-fortun, S., 1999. Toxicity of carbamates to the brine shrimp *Artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. **Env. Pollut.**, 104:469-476.
- Blair, A., Petralia, S.A., Stewart, P.A., 2003. Extended mortality follow-up of a cohort of dry cleaners. **Ann Epidemiol.**, 13(1):50-6.
- Bonassi, S., Abbondandolo, L., Camurri, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., 1995. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of a future cancer onset in humans ? Preliminary results of an italian cohort study. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 79:133-135.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. **Cytogenetic and Genome Research**, 104:376-382.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J.D., 2005. Human Population With Cytogenetic Biomarkers: Review of the Literature and Future Perspectives, **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 45: 258-270.
- Brayn, B., Timothy, M., Tore, S. 1997. General and Applied Toxicology, 2nd. Edition.1, 52.
- Brodkin, CA., Daniell, W., Checkoway, H., Echeverria, D., Johnson, J., Wang, K., Sohaey, R., Green, D., Redlich, C., Gretch, D., Rosenstock, L., 1995. Hepatic ultrasonic changes in workers exposed to perchloroethylene. **Occup Environ Med**, 52:679-685.
- Burgaz, S., 1994. Toksikoloji, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Ders Notları, Ankara.

- Bustos-Obregon, E., Vargas, Á., 2010. Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia salina* exposed to the organophosphate diazinon. **Biol Res.**, 43: 357-362.
- Cai, S.X., Huang, M.Y., Chen, Z., Liu, Y.T., Jin, C., Watanabe, T., Nakatsuka, H., Seiji, K., Inoue, O., Ikeda, M., 1991. Subjective symptom increase among dry-cleaning workers exposed to tetrachloroethylene vapor. **Ind Health.**, 29(3):111-21.
- Cederberg, H., Henriksson, J., Binderup, M.L., 2010. DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. **Mutagenesis**, 25(2):133–138.
- Calleja, M.C., Persoone, G., 1992. Cyst-based toxicity tests IV. the potential of ecotoxicological tests for the prediction of acute toxicity in man as evaluated on the first ten chemicals of the MEIC programme. **ATLA**, 20:396-405.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindi, P.A., Minkler, J.L., 1978. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. **Nature**, 271:551-553.
- Choudhary, I.M., Thomsen, W.J., 2001. Bioassay Techniques For Drug Development, Harwood Academic Publishers, 8-10.
- Choy, W.N., 2001. Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment. Marcel Dekker, 163-86, New York.
- Coler, H.R., Rossmiller, H.R., 1953. Tetrachloroethylene exposure in a small industry, **AMA Arch Ind Hyg Occup Med.**, 8:227-233.
- Çakmak, G., 2000. Trafik Polisi ve Taksi Sürücüleri Hava Kirliliği Maruziyetine Yönelik İdrarda 1-Hidroksipiren Değerlerinin, Periferal Lenfositlerde Kromozomal Aberasyon ve Mikroçekirdek Sıklığının Araştırılması, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Dellarco, L., Mavournin, K.H., Tice, R.R., 1985. Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. **Environ Mutagen**, 7:405-424.
- Demirel, S., Zamani, A., 2002. MN tekniği ve kullanım alanları. **Genel Tıp Dergisi**, 12(3):123-7.
- Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M., Perry, J.M., 1996. An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. **Mutagenesis**, 11:247–274.

- Dökmeci, I., 1994. Toksikoloji-Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi. Nobel Tıp Kitabevleri, 1-50, İstanbul.
- Eastmond, D.A., Tucker, J.D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environ Mol Mutagen.**, 13(1):34-43.
- Elhajouji, A., Hummellen, P.V., Kirsch-Volders, M., 1995. Indications for a threshold of chemically induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. **Environ Mol Mutagen**, 26:292-304.
- Elhajouji, A., Tibaldi, F., Kirch-Volders, M. 1997. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro human lymphocytes. **Mutagenesis**, 12:133-140.
- Erol, B., 2010. Kimyasalların, Kimya Öğrencilerindeki Genotoksik Etkisinin Kromozom Aberasyonu Testiyle Belirlenmesi. Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Niğde.
- Epel, D., 1963. The effects of carbonmonoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis Sea Urching egg. **J. Cell. BioP.**, 17:315-319.
- Evans, H.J, Maureen, L., O’Riordan, 1975. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, 31(3):135–148.
- Evans, H.J., 1977. Molecular Mechanisms in The Induction of Chromosome Aberrations. In: Progress in Genetic Toxicology (Sobels, D., Eds.), Elsevier North Holland Biomedical Pres, pp.57-74.
- Evans, H.J., 1990. Cytogenet.: Overview. **Prog Clin Biol Res**, 340B: 301-323.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low-dose x-irradiation. **Mutat. Res.**, 161: 193-198.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.**, 392:193-198.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999, The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutation Research**, 428:271-283.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, 455: 81-95.

- Fişek, A.G., Piyal B., 1989. İşçi Sağlığı Kılavuzu, **Türk Tabipleri Birliği Yayını**, Ankara.
- Forand, S.P., Lewis-Michl, E.L., Gomez, M.I., 2012. Adverse birth outcomes and maternal exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene through soil vapor intrusion in New York state. **Environmental Health**, 120(4):616-21.
- Gallagher, L.G., Vieira, V.M., Ozonoff D., Webster T.F., Aschengrau, A., 2011. Risk of breast cancer following exposure to tetrachloroethylene-contaminated drinking water in Cape Cod, Massachusetts: reanalysis of a case-control study using a modified exposure assessment, **Environmental Health**, 10:47.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. **Environ Mol Mutagen**, 10:1-175.
- Gennari, P., Naldi, M., Motta, R., Nucci, M.C., Giacomini, C., Violante, F.S., Raffi, G.B., 1992. gamma-Glutamyltransferase isoenzyme pattern in workers exposed to tetrachloroethylene. **Am J Ind Med.**, 21(5):661-71.
- Giri, S., Chatterjee, A., 1998. Modulation of mitomycin C-induced sister chromatid exchanges and cell cycle delay by buthionine sulfoximine and reduced glutathione in mouse bone marrow cells in vivo. **Mutat. Res.**, 413(3):227–234.
- Giri, S., Giri, A., Sharma, G.D., Prasad, S.B., 2003, Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbosulfan in bone marrow cells of mice in vivo. **Mutagenesis**, 18, 53-58.
- Green, T., Odum, J., Nash, A.J., Foster, R.J., 1990. Perchloroethylene-induced rat kidney tumors: An investigation of the mechanisms involved and their relevance to humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 103(1):77–89.
- Guttenbach, M., Schmid, M., 1994. Exclusion of specific human chromosomes into micronuclei by 5-azactidine treatment of lymphocyte cultures. **Exp Cell Res.**, 211:127-132.
- Gürkan, E., Tüzün, O.T., Hırlak, F., Sarıyar, G., 2000. Bazı Papaver alkaloidlerinin Brine shrimp yöntemiyle sitotoksikite tayinleri. **XII.Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı**, 17-66.

- Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Högstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I., Reuterwall, C., Salomaa, S., Skerfving, S., Sorsa, M., 1994. Cancer risk in human predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: nordic study group on the health risk of chromosome damage. **Cancer Research**, 54:2919-2922.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Noppa, H., Reuterwall, C., 1998. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the european study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH). **Cancer Res.**, 58:4117-4121
- Hake, C.L., Stewart, R.D., 1977. Human exposure to tetrachloroethylene: inhalation and skin contact, **Environ Health Perspect**, 21:231-238.
- Hartmann, A., Speit, G., 1995. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE), **Mutat. Res.**, 346:49-56.
- Harwig, J., Scott, P.M., 1971. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larva as a screening system for fungal toxins. **Appl Microbiol.**, 21(6):1011-1016.
- Heddle, J.A., Countryman, R.I., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. **Mutat. Res.**, 41:321-32.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1995. Tetrachloroethylene, In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals, 63:159–221, France.
- Jaki, B., Orjala, J., Bürji, H.R., Sticher, O., 1999. Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality and cytotoxicity. **Pharm. Biol.**, 37:138-143.
- Jain, A. ve Andsorbhoy, R. K., 1988. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding remarks. **Cytologia**, 53:427-436.
- Janulewicz, P.A., White, R.F., Winter, M.R., Weinberg, J.M., Gallagher, L.E., Vieira, V., Webster, T.F., Aschengrau, A., 2008. Risk of Learning and Behavioral Disorders Following Prenatal and Early Postnatal Exposure to Tetrachloroethylene (PCE)-Contaminated Drinking Water. **Neurotoxicol Teratol.**, 30(3):175–185.

- Joseph, K., McLaughlin, William, J.B., 1997. A critical review of epidemiology studies of trichloroethylene and perchloroethylene and risk of renal-cell cancer. **Int Arch Occup Environ Health**, 70:222-231.
- Karael, C., 2006. Yeni Sentezlenmiş Bazı Pirazolin Eklenmiş Triazol Türevlerinin Antimikrobiyal Aktivite ve Toksisitelerinin Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir.
- Karakaya, A.E., 1996. İş yerlerinde maruz kalınan kimyasallar ve endüstri toksikolojisi, **İşçi Sağlığı ve İş Güvenliği Bülteni**, sayı:35, Ankara.
- Kauderer, B., Zamith, H., Paumgartten, F.J., Speit, G., 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells in vitro. **Environ. Mol. Mutagen.**, 18(1):28-34.
- Kaya, M., Akyol, İ., 2000. Akut ön üveit olgularında genetik bir çalışma kardeş kromatid değişim analizi türkiye klinikleri. **J. Ophthalmol**, 9(1):31-3.
- Kurtulmuş, S., Aydın, A., 2007. Dental döküm alaşımlarının genotoksitesisi, mutajenitesi ve karsinojenitesi, **S.Ü. Diş Hek. Fak. Dergisi**, 16:73-78.
- Kirsch-Volders, M.(Ed)., 1997. The CB in vitro micronucleus assay in human lymphocytes. **Mutat. Res.**, 392: Special Issue (1,2).
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardeme, M., Albertinin, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M.J., Lorge, E., Norppa, H., Surreales, J., von der Hude, W., Wakata, A., 2000. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Environ Mol Mutagen**, 35(3):167-172.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M.J., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surreales, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A., 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, 540(2):153-163.
- Laffon, B., Pásaro, E., Méndez, J., 2001. Effects of styrene-7,8-oxide over p53, p21, bcl-2 and bax expression in human lymphocyte cultures. **Mutagenesis**, 16(2):127-132.
- Logarto, P.A., Silva, Y.R., Guerra, S.I., Iglesias, B.L., 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, 8(5):395-400.
- Latt, S.A., Allen, J.W., Rogers, W.E., Juergens, L.A., 1977. In vitro and in vivo Analysis of Sister Chromatid Exchange Formation. In: Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elsevier, pp. 275-291, New York.

- Lauwerys, R., Herbrand, J., Buchet, J.P., Bernard, A., Gaussin, J., 1983. Health surveillance of workers exposed to tetrachloroethylene in dry- cleaning shops. **Int Arch Occup Environ Health**, 52(1):69-77.
- Lewan, L., Andersson, M., Morales-gomez, P., 1992. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **ATLA**, 20:297-301.
- Lorge, E., Lambert, C., Gervais, V., Becourt-Lhote, N., Delongas, L., Claude, N., 2007. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation, Part II: Performances of the in vitro micronucleus test compared to the mouse lymphoma assay and the in vitro chromosome aberration assay. **Toxicol Sci.**, 96(2):214-7.
- Loseph, 1990. Occupational Medicine, Lange Medical Book, USA.
- Lynge, E., Andersen, A., Rylander, L., Tinnerberg, H., Lindbohm, M.L., Pukkala, E., Romundstad, P., Jensen, P., Clausen, L.B., Johansen, K., 2006. Cancer in persons working in dry cleaning in the Nordic countries. **Environ Health Perspect.**, 114(2):213-9.
- Marr, K., Bohm, B., Cooke, C., Gunning, P., 1998. Flavonoids of Hawaiian Endemic *Lysimachia* in honour of professor G.H.Neil Towers 75th Birthday. **Phytochemistry**, 49(2):553-557.
- Martinez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A., Diaz-mayans, J., 1998. Effect of cadmium exposure on zinc levels in the Brine Shrimp *Artemia partenogenetica*. **Aquaculture**, 172:315-325.
- McDermott, C., Heffron, J.J.A., 2013. Toxicity of Industrially Relevant Chlorinated Organic Solvents In Vitro. **International Journal of Toxicology**, 32(2):136-145.
- McKernan, L.T., Ruder, A.M., Petersen, M.R., Hein, M.J., Forrester, C.L., Sanderson, W.T., Ashley, D.L., Butler, M.A., 2008. Biological exposure assessment to tetrachloroethylene for workers in the dry cleaning industry. **Environmental Health**, 7:12.
- Mc Laughlin, J.L., Chang, C.J., Smith, D.L. 1991. Bench top Bioassay For the Discovery of Bioactive Natural Products: an update, Studies in Natural Products Chemistry (A.U. Rahman, Eds.). Elsevier, 383-409.
- McLaughlin, J.K., Blot William J. 1997. A Critical Review of Epidemiology Studies of Trichloroethylene and Perchloroethylene and Risk of Renal-Cell Cancer. **Int Arch Occup Environ Health**, 70:222-231.

- Meckler, L.C., Phelps, D.K., 1966. Liver disease secondary to tetrachloroethylene exposure. **JAMA**, 197(8):662-663.
- Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., Didelupis, G.D., 1997. Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. **Wat. Res.**, 31:1801-1806.
- Muranlı-Gökalp, F.D., 2006. Kültürü Yapılan İnsan Lenfositlerinde Triasulfuron'un Genotoksik Etkileri. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Edirne.
- Muzzullo, M.S., Grilli, G., Lattanzi, G., Prodi, G., Turina, M.P., Colacci, A., 1987. Evidence of DNA binding activity of perchloroethylene. **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, 58(2): 215-235.
- Natarajan, A.T., Obe, G., 1982. Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. In: *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology* (J.A. Heddele, Eds.), Academic press, pp.171-213, New York.
- Natarajan, A.T., 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. **Mutation Research**, 504:3-16.
- Nicholas, A.H., Viene, M., Berghe, H.V.D., 1979, Induction of sister chromatide xchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide: Malathion. **Mutation Research**, 67:167-172.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W., Petschelt, A., 2000. A new screening test toxicity testing of dental materials. **Jr. Dent.**, 28:341-345.
- Perry, P. and Evans, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen – carcinogen exposure by sister chromatid exchange. **Nature**, 258:121-125.
- Potter, C.L., Chang, L.W., DeAngelo, A.B., Daniel, F.B., 1996. Effects of four trihalomethanes on DNA strand breaks, renal hyaline droplet formation and serum testosterone in male F-344 rats. **Cancer Lett.**, 106(2):235-242.
- Rastkari, N., Yunesian, M., Ahmadkhaniha, R., 2011. Exposure assessment to trichloroethylene and perchloroethylene for workers in the dry cleaning industry. **Bull Environ Contam Toxicol.**, 86:363–367.
- Rencüzoğulları, E., Topaktaş, M., 1991. The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differantial staining of sister chromatids using chromosome medium-b. **Fen ve Mühendislik Dergisi**, 5(3):19-24.

- Ribas, G., Surreales, J., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1996. Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazide in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, 11: 221-227.
- Rodriguez-Mercado, J.J., Roldan-Reyes, E., Altamirano-Lozano, M., 2003. Genotoxic effects of vanadium (IV) in human peripheral blood cells. **Toxicology Letters**, 144:359-369.
- Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G., 2000. Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a BRCA1 Mutation in Breast Cancer Families. **Cancer Research**, 60:390-394.
- Ruder, A.M., Ward, E.M., Brown, D.P., 2001. Mortality in dry-cleaning workers: an update. **Am J Ind Med.**, 39(2):121-32.
- Saland, G., 1967. Accidental exposure to perchloroethylene. **NY State J Med**, 67:2359-2361.
- Sanchez-fortun, S., Sanz, F., Barahona, M.W., 1996. Acute toxicity of several organophosphorous insecticides and protection by cholinergic antagonists and 2-PAM on *Artemia salina* larvae. **Arch Environ Contam Toxicol**, 31(3):391-398.
- Savage, J.R.K., 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. **Environ Mol Mutagen**, 22:198-207.
- Seligmann, I.C., Lima, P.D.L., Cardoso, P.C.S., Khayat, A.S., Bahia, M.O., Buchi, D.F., Cabral, I.R., Burbano, R.R., 2003. The anticancer homeopathic composite "Canova Method" is not genotoxic for human lymphocytes in vitro. **Genetics and Molecular Research**, 2(2):223-228.
- Schmind, W., 1975. The micronucleus test. **Mutat Res**, 31: 9-15.
- Schwartz, S., Astemborski, J.A., Budacz, A.P., Boughman, J.A., Wasserman, S.S., Cohen, M.M., 1990. Repeated measurement of spontaneous and clastogen-induced sister-chromatid exchange. **Mutation Research**, 234:51-59.
- Shaham, J., Kaufman, Z., Gurvich, R., Levi, Z. 2001. Frequency of sister chromatid exchange among greenhouse farmers exposed to pesticides. **Mutat. Res.**, 491:71-80.
- Shen, C., Zhao, C.Y., Liu, F., Wang, Y.D., Wang, W., 2011. Acute liver failure associated with occupational exposure to tetrachloroethylene. **J. Korean Med Sci.**, 26:138-142.

- Simpson, B. ve Ogorzaly, M., 1986. Economic Botany: Plants in Our World. McGraw-Hill Publishing Company, New York.
- Sivikova, K., Dianovsky, J., 2000. Mitotic index and cell proliferation kinetics as additional variables for assessment of genotoxic effect of the herbicide modown. **ACT VET B**, 69(1):45-50
- Sleet, R.B., Brendel, K., 1983. Improved methods for harvesting and counting synchronous populations of *Artemia nauplii* for use in developmental toxicology. **Ecotoxicol, Env. Safety**, 7:435-446.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D., 1993. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. **Plant Med.**, 59:250-252.
- Speit, G., Haupter, S., 1985. On the mechanism of differential giemsa staining of bromodeoxyuridine substituted chromosomes. II. Differences between the demonstration of sister chromatid differentiation and replication patterns. **Hum. Genet.**, 70(2):126-129.
- Stewart, R.D., Erley, D.S., Schaeffer, A.W., Gay H.H., 1961. Accidental vapor exposure to anesthetic concentrations of a solvent containing tetrachloroethylene. **Indus Med Sug**, 30(8):327-330.
- Storm, J.E., Mazor, K.A., Shost, S.J., Serle, J., Aldous, K.M., Blount, B.C., 2013. Socioeconomic disparities in indoor air, breath, and blood perchloroethylene level among adult and child residents of buildings with or without a dry cleaner. **Environmental Research**, 122:88-97.
- Surralles, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos R., 1995. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. **Mutat. Res.**, 341:169-84.
- Şekeroğlu, V., Şekeroğlu-Atlı, Z., 2011. Genotoksik hasarın belirlenmesinde mikronükleus testi. **Türk Hij Den Biyol Derg**, 68(4):241-52.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M., Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: a study of malathion-exposed workers. **Mutat. Res.**, 388(1):85-95.
- Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., 1995. Sitogenetik. Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, 68-113.
- Topaktaş, M., Speit, G., 1990. Sister chromatid exchange (sce) testinin mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılması. **Ç. Ü. Sağlık Bil. Der.**, 5:73-84.

- Toraason, M., Clark, J., Dankovic, D., Mathias, P., Skaggs, S., Walker, C., Werren, D., 1999. Oxidative stress and DNA damage in Fischer rats following acute exposure to trichloroethylene or perchloroethylene. **Toxicology**, 138:43-53.
- Treece, G.D., 2000. Artemia production for marine larval fish culture. Southern Regional Aquaculture Center (SRAC) Publication, No 702.
- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobson-Kram, D., Tice, R.R., 1993. Sister chromatid exchange: second report of the Gene-tox program. **Mutation Research**, 297:101-180.
- Tucker, J.D., Preston, J.R., 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges and cancer risk assessment. **Mutation Research**, 365:147-159.
- Tucker, J.D., Sorensen, K.J., Ruder, A.M., McKernan, L.T., Forrester, C.L., Butler, M.A., 2011. Cytogenetic analysis of an exposed-referent study: perchloroethylene-exposed dry cleaners compared to unexposed laundry workers. **Environmental Health**, 10:16.
- Uğur, M.S., Gürkan, E., Tuzlacı, E., 2000. İstanbul çevresinde yetişen bazı bitkilerin fibrinolitik etkileri. **XII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı**, 670(17), 68.
- Ulusoylu, M., Soyogul, U., Gürkan, E., Tuzlacı, E., 2001. Centaurea iberica bitkisinin biyolojik aktivite tayinleri. **XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiri Kitabı**, 670(17), 287-290.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency), 1985. Chemical carcinogens: review of the science and its associated principles. Office of Science and Technology Policy. Federal Register, 50:10372-10442.
- U.S. EPA (Environmental Protection Agency), 1991. Tehlikeli Maddeler ve Raporlanabilir Miktarları. 40 CFR, 302(4):3-271.
- Üren, S., 2011. Artemia Yumurtasının Balık Larvası Beslenmesinde Kullanımı. Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Su Ürünleri Mühendisliği, Lisans Tezi, Çanakkale.
- Üstüner, D., 2011. Kromozom kırıkları ve mikronükleus-apoptoz bağlantısı. **Tünav Bilim Dergisi**, 4(1):64-69.
- Van der Gulden, J.W.J., Zielhuis, G.A., 1989. Reproductive hazards related to perchloroethylene. **Int Arch Occup Environ Health**, 61:235-242.

- Wallis, S.A., 1986. Induction of single-strand breaks in DNA of mice by trichloroethylene and tetrachloroethylene. **Toxicol Lett**, 31:31-35.
- Wang, J.L., Chen, W.L., Tsai, S.Y., Sung, P.Y., Huang, R.N., 2001. An in vitro model for evaluation of vaporous toxicity of trichloroethylene and tetrachloroethylene to CHO-K1 cells. **Chem Biol Interact**, 137(2):139-154.
- White, I.N., Razvi, N., Gibbs, A.H., Davies, A.M., Manno, M., Zaccaro, C., De Matteis, F., Pähler, A., Dekant, W., 2001. Neoantigen formation and clastogenic action of HCFC-123 and perchloroethylene in human MCL-5 cells. **Toxicol Lett**, 124:129-138.
- Yager, J.W., Paradisin, W.M., Rappaport, S.M., 1993. Sister chromatid exchanges in lymphocytes are increased in relation to longitudinally measured occupational exposure to low concentrations of styrene. **Mutat. Res.**, 319:155–165.
- Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., 2008. Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells in vivo and in vitro. **Russian Journal of Genetics**, 44(3): 273-278.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., 2006. Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. **Mutation Research**, 604(1-2):53-59.
- Zhu, Q.X., Shen, T., Ding, R., Liang, Z.Z., Zhang, X. J., 2005. Cytotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of Vitamin E. **Toxicology**, 209:55–67.

EK - 1



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Sayı : B.30.2.ADÜ.0.20.05.00/050.04-73
Konu : Çalışmanız hk.

26/03/2012

Sayın, Yrd.Doç.Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Biyoloji Bölümü

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.03.2012 tarihinde yapılan olağan toplantısında çalışmanızla ilgili alınan 8 nolu karar ilişikte sunulmuştur.
Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. M. Selim ÖZKÖK
Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı

KARAR 8

Protokol No : 2012/40
Sorumlu Yürütücü : Yrd.Doç.Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK
ADÜ Fen-Edebiyat Fak.
Biyoloji Bölümü

ADÜ Fen ve Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Tülay AŞKIN ÇELİK'in "Perkloretilen (PERC) in sitotoksik ve invitro genotoksik etkisinin farklı sistemleri ile araştırılması" konulu yukarıda bilgileri verilen klinik araştırma başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda;

- Çalışmada gönüllülerden alınacak kanların bir sağlık personeli tarafından alınması.
- Çalışma yönteminde sağlık personeli tarafından hangi koşullarda kanların alınacağı belirtilmesi ve ayrıca bu bilginin de Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunda açıklanması.
- Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formunun amacının ve nasıl bir uygulama yapılacağına ilişkin gönüllünün anlayacağı şekilde tıbbi terminoloji kullanılmadan, açık, anlaşılır bir ifadeyle yazılması ve "Çalışmaya katılma ile beklenen olası yarar nedir?" kısmında "Bu araştırmadan.....beklenmektedir." olan ifadenin "doğrudan yarar görülmesi beklenmemektedir" olarak değiştirilmesi gerekmektedir.

Bu nedenle yukarıdaki düzeltmelerin yapıp dosyaya konulmak üzere dilekçe ekinde gönderilmesi şartıyla çalışmanın yapılmasında etik açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliğiyle karar verilmiştir.

Adres: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Merkez Kampüsü - Kepez Mevki- AYDIN

Araştırmanın Adı : PERKLORETİLEN (PERC)'İN SİTOTOKSİK VE İN-VİTRO GENOTOKSİK ETKİSİNİN FARKLI TEST SİSTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

PERKLORETİLEN (PERC)'İN SİTOTOKSİK VE İN-VİTRO GENOTOKSİK ETKİSİNİN FARKLI TEST SİSTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (FORM 4)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Bu çalışmanın amacı; kuru temizleme işyerlerinde kuru temizleme amacı ile kullanılan Perkloretilen (PERC)'in hücre bölünmesi üzerindeki etkisinin (Sitotoksik) ve genetik materyal olan kromozomlar üzerindeki etkisinin (in vitro Genotoksik etki) farklı test sistemleri ile araştırılmasıdır.

KATILMA KOŞULLARI NEDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için en az bir yıldır aynı işyerinde çalışıyor olmanız, sigara, alkol alışkanlığınızın olmaması ve herhangi bir hastalığa karşı ilaç kullanmıyor olmanız gerekir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

Araştırmada seçilen gönüllülerden (kontrol ve deney grubu) kan örnekleri alınacaktır. Kan alma işlemi, 30 günlük zorunlu staj dönemini Gaziantep Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi kan alma biriminde yapmış ve bu konuda yeterli deneyim kazanmış olan Yüksek Lisans Öğrencisi Ümit ÜNSAL tarafından yapılacaktır. Kendisi aynı zamanda bu araştırma projesinde yardımcı eleman olarak da yer almaktadır. Seçilen kontrol ve deney gruplarından kan alma işlemi, kapalı alan içerisinde gerçekleştirilecek olup, kan alma işlemi, kan alınacak kol alkol ile steril edildikten sonra steril heparinli enjektör yardımı ile yapılacaktır. Bütün bu işlemler standart kan alma prosedürüne uygun şekilde gerçekleştirilecektir.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırmaya dahil olan gönüllülerin herhangi bir sorumluluğu yoktur.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 20 'dir.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR?

Bu araştırmada yer almanız için öngörülen süre 10 dakikadır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu araştırmadan sizin için tıbbi olarak bir yarar sağlamanın söz konusu olmadığı ancak bu çalışmadan çıkarılan sonuçların başka insanların yararına kullanılabilir olması, yalnızca araştırma amacı olduğu ve doğrudan yarar görmesi beklenmemektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

KAN ÖRNEKLERİNİN SAKLANMASI

Sizden alınan örneklerin kullanımı bu olur formunda tanımlanan araştırma ile sınırlı olacaktır. Eğer bu örnekleri bu olur formunda tanımlanmayan başka test/amaçlar için kullanmak istersek, önce Etik

Tarih/ Versiyon: 09.03.2012

Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	26.01.2012/ADÜTF GOEK02	1/2
Form 4		

Araştırmanın Adı : PERKLORETİLEN (PERC)'İN SİTOKSİK VE İN-VİTRO GENOTOKSİK ETKİSİNİ FARKLI TEST SİSTEMLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Kurul'a onay verilmesi için başvurulacaktır. Eğer yeni çalışma onaylanacak olursa sizden başka bir bilgilendirilmiş olur formu imzalamanız istenecektir.

ARAŞTIRMA SÜRECİNDE BİRLİKTE KULLANILMASININ SAKINCALI OLDUĞU BİLİLEN İLAÇLAR/BESİNLER NELERDİR?

Çalışma süresince birlikte kullanımının sakıncalı olduğu ilaç ve besinler yoktur.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?

Çalışmayı destekleyen kurum Adnan Menderes Üniversitesi'dir.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırmacı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırmacı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler bilimsel amaçla kullanılmayacaktır.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MIDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 4 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

Tarih/ Versiyon: 09.03.2012

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
	Form 4	26.01.2012/ADÜTF GOEK02	2/2

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ümit ÜNSAL

Doğum Yeri ve Tarihi : Sincan/1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Gaziantep Üniversitesi – Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi – Biyoloji Bölümü

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

-SCI

-Diğer

b) Bildiriler

-Uluslararası:

-Ulusal:

1. Aşkın Çelik,T., Aslantürk, Ö.S., Sarıkavaklı, N., **Ünsal. Ü.**, Alper, H., Hidrazon Grubu Taşıyan vic-Dioksim Ligandı ve Onun Bakır Cu (II) Kompleksinin İnsan Kolon Kanseri Hücreleri (Caco-2) Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin Araştırılması, IV. Multidisipliner Kanser Araştırma Kongresi, Bildiriler Özet Kitabı. 13-16 Aralık 2012, Bursa (Poster Bildiri)

2. Aşkın Çelik, T., Aslantürk, Ö.S., Telli, M., **Ünsal Ü.**, Güray, T., Doğal yöntemlerle elde Edilmiş Bitkisel İçerikli Anti-akne Sabunu, II. Ulusal Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi. Bildiriler Özet Kitabı, 18-20 Şubat, Antalya, 2012 (Poster Bildiri, Poster 1.lik Ödülü).

3. Aşkın Çelik, T., Aslantürk, Ö.S., **Ünsal, Ü.**, Sarıkavaklı, N., Ceviz Yaprağı ve Turunç Kabuğu Ekstrelerinde Saç Boyamasında Oksidasyon İşlemi İçin Kullanılan Hidrojen Peroksit'i Süpürme Aktivitelerinin Belirlenmesi, I. Ulusal Kozmetik Kimyası, Üretimi ve Standardizasyonu Kongresi. 17-19 Şubat, Antalya, 2011(Poster Bildiri, Poster 1.lik Ödülü).

4. Can, C., Sevil, G. ve **Ümit, Ü.**, Güneydoğu Anadolu Bölgesine Ait *Ascochyta rabiei* (Labr.) Pass İzolatlarının Patojenite Analizleri, 14.Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, Konya, 2007 (Sözlü Bildiri)

c) Katıldığı Projeler :

1. Perkloretilen (PERC)'in Sitotoksik ve in vitro Genotoksik Etkisinin Farklı Test Sistemleri ile Araştırılması (BAP FEF-12030 nolu proje – Araştırmacı)

2. Vic-Dioksin Türevleri ve Onların Cu(II), Ni(II), Urasil(UO₂) Metal Komplekslerinin MCF-7 ve Caco-2 Kanser Hücreleri Üzerindeki in vitro Sitotoksik Etkisinin Araştırılması (BAP FEF-11005 nolu proje - Araştırmacı)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : umitunsl@hotmail.com

Tarih :