

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Fatma Funda KAYA

**GIDA KATKI MADDESİ OLAN POTASYUM BROMAT’IN İNSAN
PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK
ETKİLERİ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2005

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GIDA KATKI MADDESİ OLAN POTASYUM BROMAT'IN İNSAN
PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* GENOTOKSİK
ETKİLERİ**

Fatma Funda KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

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

İmza.....

İmza.....

İmza.....

Prof.Dr. Mehmet TOPAKTAŞ

Prof.Dr. Rüştü HATİPOĞLU

Doç.Dr. Eyüp RENCÜZOĞULLARI

DANIŞMAN

ÜYE

ÜYE

Bu tez Enstitümüz Biyoloji Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ

Enstitü Müdürü

İmza ve Mühür

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından Desteklenmiştir.

Proje No: FEF. 2003.YL.29

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

ÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**GIDA KATKI MADDESİ OLAN POTASYUM BROMAT'IN İNSAN
PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE IN VITRO GENOTOKSİK
ETKİLERİ**

Fatma Funda KAYA

**Çukurova Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman : Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Yıl: 2005, Sayfa: 82**

**Jüri: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**

Bu çalışmanın amacı, unda beyazlatıcı madde olarak kullanılan Potasyum bromat'ın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olup olmadığını kardeş kromatid değişimi (KKD=SCE), kromozom aberasyonu (KA) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmak ve bu testler yardımı ile insanlar için herhangi bir genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını saptamaktır. Hücreler 400, 450, 500, 550 µg/ml konsantrasyonlarda Potasyum bromat'la 24 ve 48 saat muamele edilmiştir.

Bu çalışmada, Potasyum bromat 24 saatlik muamele süresinde KKD'yi kontrole nazaran genel olarak artırmış fakat bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Halbuki 48 saatlik muamele süresinde ise KKD'yi tüm konsantrasyonlarda kontrole nazaran önemli derecede uyarmıştır. KA, kontrole göre tüm dozlarda ve 24 saatlik muamele süresinde uyarılmıştır. 24 saatlik muamele süresinde tüm dozlarda saptanan AH yüzdesinin pozitif kontroldekinden (MMC) yüksek olduğu, fakat aradaki farkın önemli olmadığı saptanmıştır. Potasyum bromat'la 24 saat muamele edilen kültürlerde hücre başına düşen anormallik sayısının (KA/hücre) kontrolden istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu ve bu artışın da doza bağlı olduğu bulunmuştur. Potasyum bromat'la 48 saat muamele edilen kültürlerde AH oranının tüm muamele sürelerinde kontrole nazaran önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu muamele süresinde hücre başına düşen anormallik sayısının kontrolden önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. 48 saatlik muamele süresinde hücre başına düşen anormallik sayısının doza bağlı artış gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanında, Potasyum bromat'ın 24 ve 48 saatlik muamelelerde hem replikasyon indeksini (RI) hem de mitotik indeksi (MI) olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Potasyum bromat 24 saatlik muamelede mikronukleus oluşumunu doza bağlı olarak uyarmıştır. 48 saatlik muameleli kültürlerde ise mikronukleuslu hücre oranının kontrole nazaran daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: İnsan periferik lenfositleri, potasyum bromat, Kardeş Kromatid Değişimi (KKD), Kromozom Aberasyonu (KA), Mikronukleus (MN)

ABSTRACT
MSc THESIS

**THE GENOTOXIC EFFECTS OF FOOD ADDITIVE POTASSIUM
BROMATE ON HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTES IN
VITRO**

Fatma Funda KAYA

**Department of Biology
Institute of Natural and Applied Sciences
University of Çukurova**

**Supervisor: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Year: 2005, Pages: 82**

**Jury: Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ
Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU
Assoc. Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**

The aim of this study was to investigate genotoxic effect of Potassium bromate which used as bleaching agent in flour, on human peripheral blood lymphocytes by determining sister chromatid exchange (SCE), chromosomal aberrations (CA) and micronucleus tests (MN) and determine whether the chemical has any genotoxic potential for humans. Cells were treated with 400, 450, 500, 550 µg/ml concentrations of potassium bromate for 24 and 48 hours.

In this study, 24 hours treatments of Potassium bromate increased generally the SCE frequency but differences between the treatments and control were not statistically significant. However, Potassium bromate increased the SCE frequency statistically significant when compared with control at all used concentrations for 48 hours treatment periods. In addition, CA were also induced at all concentrations for 24 hours treatment periods. It was found that increasing the percentage of abnormal cells (AH%) was higher than that of positive control (MMC), however this difference was not statistically significant. During the 24 hours treatment periods, potassium bromate significantly increased the frequency of CA per cell when compared with control. This inducing was also dose-dependently. The percentage of abnormal cells (AH%) was increased at all the concentrations for 48 hours treatment period. Additionally, Potassium bromate decreased both the replication index (RI) and mitotic index (MI), for 24 and 48 hours treatment periods. Micronucleus formation was induced by Potassium bromate at 24 hours treatment period in a dose-dependent manner without statistically significant. However, at 48 hours treatment period, the frequency of the micronucleated cells were statistically increased when compare with the control.

KeyWords: Human peripheral lymphocytes, potassium bromate, Sister Chromatid Exchange (SCE), Chromosome Aberration (CA), Micronukleus (MN)

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve çalışmalarım sırasında bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam **Prof. Dr. Mehmet TOPAKTAŞ**'a sonsuz minnetlerimi sunarım.

Genetik laboratuvarında beraber çalıştığım ve her türlü yardımlarını gördüğüm Sayın **Doç. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI**, **Yrd. Doç. Dr. Hasan Basri İLA**, **Arş. Gör. Ahmet KAYRALDIZ**, **Arş. Gör. Songül BUDAK DİLER**, **Arş. Gör. Ayşe YAVUZ**, **Biyolog Semir CANIMOĞLU** ve **Biyolog Arzu YAVUZ**'a teşekkür ederim.

Ayrıca kızları olmaktan gurur duyduğum annem **Ferdane KAYA** ve babam **Muharrem KAYA**'ya bana her zaman verdikleri destek için teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu yöneticilerine de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER ve KISALTMALAR... ..	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
1.GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. Benzoil Peroksit İle Yapılmış Kanserojenite ve Genotoksisite Çalışmaları.....	7
2.2. Klor İle Yapılmış Kanserojenite, Toksisite ve Mutajenite Çalışmaları.....	10
2.3. Klor Dioksit İleYapılmış Kanserojenite, Toksisite ve Mutajenite Çalışmaları.....	11
2.4. Potasyum Bromat İle Yapılmış Kanserojenite ve Genotoksisite Çalışmaları.....	11
2.5. Potasyum İyodat İle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	17
2.6. Propionik Asit İle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	17
2.7. Sodyum Propiyonat İle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	18
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları.....	19
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
3.1.1.1. Potasyum Bromat.....	19
3.1.1.1.(1) Potasyum Bromat’ın Kullanım Alanları.....	19
3.1.1.1.(2). Potasyum Bromat’ın Vücuda Giriş Yolları ve Etkileri..	22
3.1.1.1.(3). Vücuda Giren Potasyum Bromat’ın Durumu.....	23
3.1.1.1.(4). İnsan Vücudu Üzerine Potasyum Bromat’ın Etkisi.....	24
3.1.1.1.(5). Vücutda Potasyum Bromat Düzeyinin Saptanması.....	24
3.1.1.1.(6). Potasyum Bromat’ın Özellikleri.....	24

3.1.1.2. Mitomycin C (MMC).....	25
3.1.1.3. Kromozom Medyumu.....	26
3.1.1.4. Kolkisin.....	26
3.1.1.5. Hipotonik Eriyik.....	27
3.1.1.6. Fiksatif.....	27
3.1.1.7. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd).....	27
3.1.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer).....	28
3.1.1.9. Standart Saline Citrate (SSC) Eriyiği.....	28
3.1.1.10. Giemsa.....	28
3.1.1.11. Entellan.....	29
3.1.1.12. Nitrik Asit (HNO ₃).....	29
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	29
3.1.2.1. Hassas Terazî.....	29
3.1.2.2. Santrifüj.....	29
3.1.2.3. Mikroskop.....	29
3.1.2.4. İnkübatör.....	30
3.2. Lamların Temizlenmesi.....	30
3.3. Sterilizasyon.....	30
3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu.....	30
3.3.2. Saf Suyun Sterilizasyonu.....	30
3.4. Kardeş Kromatid Değişimini (KKD) (Sister Chromatid Exchange=SCE) ve Kromozomal Anormallikleri (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	31
3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	31
3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması.....	32
3.5. Mikroskopik İnceleme.....	33
3.5.1. KKD ve Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI) Saptanması.....	34
3.5.1.1. KKD Sayısının Saptanması.....	34
3.5.1.2. Replikasyon İndeksinin (RI) (Proliferasyon İndeksi=PI)	

Saptanması.....	34
3.5.2. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI)	
Saptanması.....	39
3.5.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması.....	39
3.5.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması.....	40
3.6. <i>In Vitro</i> Mikronukleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması,	
Preparatların Hazırlanması ve Boyanması.....	40
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması.....	40
3.6.2. Preparatların Boyanması.....	42
3.6.3. Mikroskopik İnceleme.....	42
3.7. Mikroskopta Fotoğraf Çekme.....	43
3.8. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	43
4. BULGULAR.....	45
4.1. Potasyum Bromat'ın Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki	
Etkileri.....	45
4.2. Potasyum Bromat'ın Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu	
Üzerindeki Etkileri.....	46
4.3. Potasyum Bromat'ın DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme	
Üzerindeki Etkileri.....	56
4.4. Potasyum Bromat'ın Mikronukleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	60
5. TARTIŞMA.....	65
5.1. Potasyum Bromat'ın KKD ve KA'yı Uyarması.....	65
5.2. Potasyum Bromat'ın Mitoz Bölünme ve DNA Replikasyonu Üzerindeki	
Etkileri.....	67
5.3. Potasyum Bromat'ın Mikronukleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	68
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	69
KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	80

Çizelge 4.1. Değişik Dozda Potasyum Bromat ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Ortalama KKD Sayısı.....	45
Çizelge 4.2. Değişik Dozda Potasyum Bromat ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı ve KA/Hücre.....	47
Çizelge 4.3. Değişik Dozda Potasyum Bromat ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde RI ve MI.....	57
Çizelge 4.4. Değişik Dozda Potasyum Bromat İle Muamele Edilmiş İnsan Periferal Lenfositlerinde Mikronukleus Frekansı.....	61

Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit 1990'den).....	35
Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.....	35
Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaş ve Speit 1990'den).....	37
Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları. x1000.....	38
Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları. x1000.....	38
Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları.x1000.....	39
Şekil 3.7. İki nukleuslu hücre.x1000.....	43
Şekil 4.1. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre'nin Doza Bağlı Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	48
Şekil 4.2. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre'nin Doza Bağlı Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	48
Şekil 4.3. Kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (550 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	49
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (a) (B') ve kromozom kırığı (b) (B'') bulunan metafaz plağı (550 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	49
Şekil 4.5. Kromatid kırığı (a) (B') ve disentrik kromozom (c) (DS) bulunan metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♂). X1000.....	50
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (a) (B'), fragment (d) (F) ve kromatid değişimi (e) (KD) bulunan poliploidi hücre (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik	

muamele, ♀). X750.....	50
Şekil 4.7. Quadriradial figürlü kromatid değişimi (e) (KD) ve kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (500 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	51
Şekil 4.8. Fragment (d) (F), kromatid kırığı (a) (B'), kromozom kırığı (b) (B'') ve triradial figürlü kromatid değişimi (e) (KD) bulunan metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	51
Şekil 4.9. Kromatid değişimi (e) (KD) ve kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	52
Şekil 4.10. Kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	52
Şekil 4.11. Kardeş kromatid birleşmesi (f) (KKB) ve kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (450 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	53
Şekil 4.12. Kromatid kırığı (a) (B') ve kromozom kırığı (b) (B'') bulunan metafaz plağı (450 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	53
Şekil 4.13. Kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (500 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000.....	54
Şekil 4.14. Endoredublikasyonlu (E) metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	54
Şekil 4.15. Çok sayıda kromozom anormalliği içeren metafaz plağı (550 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	55
Şekil 4.16. Kromatid kırığı (a) (B'), kromozom kırığı (b) (B'') ve kromatid değişimi (e) (KD) bulunan metafaz plağı (400µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	55
Şekil 4.17. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde RI'nin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve	

Korelasyon Katsayısı.....	58
Şekil 4.18. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MI'nin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	58
Şekil 4.19. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MI'nin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	59
Şekil 4.20. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MN'li Hücrelerin Yüzdesinin Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	62
Şekil 4.21. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MN'li Hücrelerin Yüzdesinin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı.....	62
Şekil 4.22. 3 mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	63
Şekil 4.23. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	63
Şekil 4.24. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (500 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

AH:	Anormal Hücre
B':	Kromatid kırığı
B'':	Kromozom kırığı
BBE:	Bromodeoksi uridine Boyama Endeksi
BrdUrd:	5'-Bromo-2'-Deoxyuridine
CA:	Chromosome Aberration
CHO:	Chinese Hamster Ovary
CHL:	Chinese Hamster Lenfositler
CSL:	Kalsiyum stearol-2-laktilat
DS:	Disentrik Kromozom
dT:	Deoxytimidin
dU:	Deoxyuridine
DNA:	Deoksiribonukleik Asit
E:	Endoredublikasyon
EHEN:	N-etil-N-hidroksietilnitrosamin
EOM:	Etoksile edilmiş monogliserit
F:	Fragment
G:	Gap
γ :	Gamma ışını
GMS:	Gliserol monostearat
GOX:	Glukoz oksidaz
HOX:	Heksoz oksidaz
HPLC:	High Pressure Liquid Chromatography (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)
IARC:	International Agency for Research on Cancer (Kanser Araştırmaları Uluslar Arası Kurumu)
i.p.:	İntraperitoneal
KA:	Kromozomal Anormallik
KBr:	Potasyum bromür

KBrO₃:	Potasyum bromat
KCl:	Potasyum klorür
KD:	Kromatid Değişimi
KKB:	Kardeş Kromatid Birleşmesi
KKD:	Kardeş Kromatid Değişimi
LD₅₀:	Bir kimyasalın, kullanılan deneklerin yarısını öldüren toksik dozu
LDH:	Laktat Dehidrojenaz
LP:	Lipid Peroksidasyonu
MI:	Mitotik indeks
MMC:	Mitomycin C
NaCl:	Sodyum klorür
NTP:	National Toxicology Program (A.B.D. Ulusal Toksikoloji Programı)
P:	Poliploidi
PBN:	alfa-fenil-N-tert-butyl
PI:	Proliferasyon indeksi
ppb:	mikrogram/kg
RI:	Replikasyon indeksi
rpm:	Round (Rotor) Per Minute
SCE:	Sister Chromatid Exchange
8-oxodG:	8-oksodeoksiguanozin
SMG:	Süksinile edilmiş monogliserit
SSC:	Standart Saline Citrate
SSL:	Sodyum stearyl-2-laktilat
SU:	Sister Union
T:	Translokasyon
TBARS:	Thiobarbiturik asit
T_k:	Timidin kinaz
UV:	Ultraviole (Morötesi)
VHL geni:	Von Hippel-lindau geni
WHO:	World Healthy Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

1.GİRİŞ

Gıda katkı maddeleri, besinlerin hazırlanması sırasında ilave edilen fakat normal olarak besinin kendi içeriğinde bulunmayan maddeler olarak tanımlanırlar. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde gıda katkı maddeleri “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler” olarak tanımlanmaktadır (Boyacıoğlu, 2002). Belirli görevleri olan çok çeşitli gıda katkı maddeleri [renklendiriciler, antimikrobiyal maddeler, tatlandırıcılar, emülsifiyerler (yağlarla suyun karışımını sağlayan maddeler), enzimler, pH’yı kontrol eden maddeler, koku vericiler gibi] vardır.

Kullanımı insanlık tarihi kadar eski olan ekmekte de bir çok gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Türk Gıda Kodeksine göre ekmek, “buğday ununa içme suyu, tuz, maya, gerektiğinde enzim, tahıl unları, soya unu, bitkisel yağ, sakkaroz, glikoz şurubu, buğday kepeği, kuru gluten ve benzeri maddeler ile Türk Gıda Kodeksinde izin verilen katkı maddeleri katılarak hazırlanan karışımın tekniğine uygun şekilde yoğurulup fermentasyona bırakılması ve pişirilmesi ile yapılan ürün” olarak tanımlanmaktadır (Boyacıoğlu, 1998a).

Tüm dünyada temel gıda maddesi olan ekmek üretimi için un, su, tuz ve maya ana bileşenler olarak kabul edilmekte, ekmeğin üretim formülüne ilave edilen maddeler isteğe bağlı bileşenler veya ekmek katkı maddeleri olarak ifade edilmektedir.

Ekmek katkı maddeleri; fırın ürünlerine üretim sırasında, normal olarak oldukça düşük oranlarda, ilave edilen çeşitli türlerdeki maddeler olarak tanımlanabilir. Söz konusu katkı maddelerinin kullanım amacı, genel olarak, üretimin gerçekleştirilmesini kolaylaştırmak veya son üründe yumuşaklık, lezzet, raf

ömrü, vb gibi kalite özelliklerinin geliştirilmesini sağlamaktır. Ekmek üretiminde kullanılan tüm katkı maddelerinin, uygun oranlarda kullanıldıklarında, üretim ve ekmeğin son kalitesi üzerine olumlu olarak etki ettiği ileri sürülmektedir (Pyler, 1994: Boyacıoğlu, 1998b'den).

Başlıca ekmek katkı maddeleri şunlardır:

1.Enzimler

Ekmek üretiminde önemli olan enzim kategorileri; nişastayı basit şekerlere parçalayan amilazları da içeren karbohidrazlar, hamurda mevcut proteinleri modifiye eden proteinazlar ve buğday ve undaki yağları hidrolize eden lipazlardır. Başlıca enzimler: amilazlar, lipoksigenaz, glukoz oksidaz (GOX), heksoz oksidaz (HOX), pentozanaz ve proteazlardır (Pyler, 1994: Boyacıoğlu, 1998b'den).

2.Okside Edici, Yükseltgen Maddeler

Oksidasyon, hamur üzerine uzayabilirliğinin azalması, uzamaya karşı direncinin artması ve sülfidril içeriğinin azalması şeklinde etki etmektedir. Bu amaçla kullanılan başlıca maddeler: askorbik asit, potasyum iodat, kalsiyum iodat, aseton peroksit, kalsiyum peroksit, azodikarbonamiddir (Anonymous, 1988: Boyacıoğlu, 1998b'den).

3.Hamuru Uygun Duruma Getiriciler, Hamur Kuvvetlendiriciler, Ekmek İçini Yumuşatıcılar, Emülgatörler, Yüzey Aktif Maddeler

Bu amaçla kullanılan başlıca maddeler: sodyum stearol-2-laktilat (SSL), kalsiyum stearol-2-laktilat (CSL), DATA esterleri, etoksile edilmiş monogliserit (EOM), polisorbitat 60, süksinile edilmiş monogliserit (SMG), sorbitan monostearat, monogliseritler, gliserol monostearat (GMS), lesitindir (Boyacıoğlu, 1998b).

4.Küf Önleyiciler

Küf önleyiciler, gıdaya ilave edildiğinde küf gelişimini durduran veya önemli derecede geciktiren ve gıdanın küfsüz raf ömrünü uzatan maddelerdir. Ekmek yapımında yaygın olarak kullanılan küf önleyici maddelere propionik asit, kalsiyum propionat, sodyum propionat, sodyum diasetat, asetik asit (sirke) ve monokalsiyum fosfat örnek verilebilir. (Boyacıoğlu, 1998b).

Türkiye’de un ve ekmek katkısı olarak 1983 yılından beri Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği’nde kullanılması uygun görülen katkı maddelerinin katılma amacı; buğday ve unda belirlenen eksiklikleri gidererek daha kaliteli bir ekmek üretmek, bozulmalar ve buğdaydan kaynaklanan, undaki mantar hastalıklarını önlemektir. Bu nedenle enzimler, C vitamini (askorbik asit), emülgatörler (besinlerin emülsiyon halinde kalmasını sağlayan maddeler) ve koruyucu maddeler Avrupa ve Amerika’da olduğu gibi bizde de kullanılmaktadır. Ayrıca ekmeğin kalitesini arttıran bir faktör de kullanılan unun beyazlığıdır. Ekmek yapımında un beyazlatıcı olarak kullanılan katkı maddelerinden biri de Potasyum bromat ($KBrO_3$)’tır.

Avrupa Birliği ülkelerinden İngiltere hariç günümüze kadar hamur güçlendirici olarak Potasyum bromat kullanımına izin verilmektedir.

Türkiye’de ekmeklere katılan Potasyum bromat miktarını kontrol etmek mümkün değildir. Toplam 1000’den fazla un fabrikası yanında küçük kapasiteli imalathane tipi tesisler de oldukça fazladır. Pek çok firmada eğitimli teknik eleman yerine ustalar görev yapmaktadır. Kalitesiz unları düzeltereği ümidiyle gelişigüzel, gereksinimden fazla ağartıcı kullanılması un niteliğini bozabilir. Ayrıca gıda katkı maddelerinin genotoksik etkiye sahip olup olmadığının kısa süreli testler ile belirlenmesi gerekir.

Perry ve Evans (1975), tarafından mutajen ve kanserojenlerin kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange = SCE) ve kromozom aberasyonunu (KA) (Chromosomal Aberration = CA) uyardığını saptamalarından sonra mutajen ve kanserojenlerin belirlenmesinde kullanılmaya başlanan kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanlar; kardeş kromatid değişimi

(KKD) (Sister Chromatid Exchange = SCE) ve kromozom aberasyonu (KA) (Chromosomal Aberration = CA) testleridir. Carrano ve ark. (1978), mutajen ve kanserojenlerin toksik dozların altındaki dozlarda meydana getirdikleri genetik hasarların kısa zamanda, hassas bir şekilde ve kantitatif olarak gösterilmesinin KKD ve KA analizi ile mümkün olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacılar bir maddenin mutasyon meydana getirmesi ile KKD oluşumunun uyarılması arasında lineer bir ilişki olduğunu da belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi bir maddenin mutajen ve kanserojen olup olmadığının belirlenmesi, bu maddenin KKD ve KA'yı uyarıp uyarmadığının saptanması ile mümkün olabilmektedir.

Genotoksitenin belirlenmesinde kullanılan bir başka metod mikronükleus (MN) testidir. Mikronükleus hücre bölünmesinin anafaz evresinde kromozomların geri kalmasından ya da asentrik kromozom fragmentlerinden kaynaklandığı gibi, multipolar anafaz ve telofaz da mikronükleus oluşumuna sebep olmaktadır (Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995). Rothfuss ve ark (2000), meme kanserinin oluşumundan sorumlu olan gendeki (BRCA1) mutasyonların sitogenetik olarak belirlenmesinde MN testinin güvenilir bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada BRCA1 geni mutasyona uğramış kişilerin lenfositlerinin gamma (γ) ışınları ile ışınlandırılmasından sonra MN'li binükleer hücrelerin oranının arttığı saptanmıştır. Uzun zamandan beri uygulanan sitogenetik bir teknik olan MN testi mitoz bölünme geçiren tüm bitki, hayvan ve insan hücrelerinde, fiziksel ve kimyasal ajanların meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesinde güvenli olarak kullanılmaktadır.

Potasyum bromat'ın genotoksik etkilerini araştırmak amacıyla bugüne kadar bir çok çalışma yapılmıştır. Ishidate ve ark (1984), Potasyum bromat'ın ilk genotoksik taramasını Çin hamster fibroblast hücrelerinde 3 mg/petri dozda *Salmonella*/mikrozom (AMES) testi ve 0,25 mg/ml dozunda Çin hamster fibroblast hücrelerinde kromozom anormalliği testi ile araştırmışlar, Potasyum bromat'ın her iki testte de genotoksisite yönünden pozitif sonuç verdiğini belirlemişlerdir.

Fujie ve ark (1988), Potasyum bromat'ı erkek Long-Evans sıçanlarına 165-501 mg/kg dozlarda intraperitoneal ve intra gastrik (gavaj) olarak vermişler, erkek Long-Evans sıçanlarının kemik iliği hücrelerinde doza bağlı olarak intraperitoneal

enjeksiyonun 12 saat sonrasında maksimum dereceye ulaşan kromozomal anormallikler tespit etmişlerdir.

Hayashi ve ark (1988), erkek ddY farelerinde Potasyum bromat'ın 0-400 mg/kg dozlarında mikronukleus testi ile genotoksik etkisini araştırmışlar, tek intraperitoneal enjeksiyon sonucunda mikronukleus oluşumunu saptamışlardır.

Awogi ve ark (1992), Potasyum bromat'ı CD-1 erkek farelerine 0-250 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak vermişler, periferik kan retikülositlerinde mikronukleus testi ile önemli derecede mikronukleus oluşturduğunu saptamışlardır.

McLaren ve ark (1994), Potasyum bromat'ın erkek Wistar sıçanlarına 20-80 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak enjeksiyonundan sonra, böbrek korteksinden çekirdek izolasyonu yapmışlar ve poli ADP-ribosil transferaz aktiviteleri ve nötr filtre elusyon yöntemi ile DNA'da iki iplik kırılmalarında artışlar belirlemişlerdir.

Ballmaier ve Epe (1995), Potasyum bromat'ın L1210 fare lösemi hücreleri ve LLC-PK1 domuz böbrek hücrelerinde DNA hasarını 0-10 mM dozlarda araştırmışlar, *in vitro* koşullarda, sadece glutatyon eklendikten sonra DNA hasarı görüldüğünü ve LLC-PK1 hücrelerinde, L1210 hücrelerine nazaran DNA hasarının 2 kat fazla olduğunu ayrıca HPLC ile DNA hasarlarının çoğunun 8-hidroksiguanin olduğunu saptamışlardır.

Speit ve ark (1999), Potasyum bromat'ın V79 hücrelerinde genotoksik etkisini 8-oksodeoksiguanozin (8-oxodG) miktarlarını komet ve HPLC ile ölçerek araştırmışlar ve 5-20 mM dozlarda oksidatif DNA hasarı ve mutasyon saptamışlardır.

Robbiano ve ark (1999), sıçan ve insan böbrek birincil doku kültürü hücreleri ve sıçan böbreklerinde Potasyum bromat'ın mikronukleus ve DNA hasarı oluşturmasını komet ve mikronukleus testlerini kullanarak araştırmışlar, bu çalışmada 0.56-1.8 mM dozlarda istatistiksel olarak kontrollere nazaran önemli derecede DNA hasarı ve mikronukleus oluşumunu belirlemişlerdir.

Kargalioğlu ve ark (2002), Potasyum bromat'ın 10^{-3} - 10^3 mM dozları arasında yaptıkları çalışmada 454 mM'da *Salmonella*'da çoğalmayı kontrole nazaran %50 düşürdüğünü bulmuşlardır.

Plewa ve ark (2002), Potasyum bromat'ın sitotoksik ve genotoksik etkilerini araştırmışlar, sitotoksik etkisini *Salmonella* mikropate sitotoksisite testi ile 0.0005-

100 mM dozlarda yaptıkları çalışmalarda *Salmonella* hücrelerinde 454 mM'da hücrelerin kontrolün %50'si kadar ürediğini bulmuşlar ve genotoksik etkisini tek hücre jel elektroforez testi (komet) ile 5-10 mM dozlarda CHO AS52 hücrelerinin 0.963 mM'da kontrolün %50'si kadar ürediğini ve CHO AS52 hücrelerinin genotoksik potansiyelini 1.2 g/L olarak belirlemişlerdir.

Poul ve ark (2004), CHO hücrelerinde Potasyum bromat'ın genotoksik etkilerini komet ve mikronukleus testlerini kullanarak araştırmışlar, 10 mM'da her iki testte DNA hasarı ve mikronukleuslu hücrelerin frekansını arttırdığını saptamışlardır.

Yukarıdaki çalışmalardan da görüldüğü gibi Potasyum bromat'ın insan kanında *in vitro* genotoksik etkisiyle ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. İşte bu çalışmanın amacı, un beyazlatıcısı olarak kullanılan Potasyum bromat'ın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olup olmadığını kromozom aberasyonu (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD=SCE) ve mikronukleus (MN) testleri ile araştırmak ve bu testler yardımı ile insanlar için herhangi bir genotoksik risk oluşturup oluşturmadığını saptamaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Bu araştırma ile ilgili olarak, un beyazlatıcı ve ekmek katkı maddeleri ile yapılan kanserojenite ve genotoksidite çalışmaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

2.1. Benzoil Peroksit İle Yapılmış Kanserojenite ve Genotoksisite Çalışmaları

Bilindiği üzere taze öğütülmüş un sarı renkte olup birkaç hafta sonra doğal olarak beyazlamakta veya ağarmaktadır. Ancak bazı piyasalarda hala ağartmaya talep söz konusu olduğundan, seyreltilmiş toz formdaki Benzoil peroksit, doğal olarak oluşan bir madde olan ksantofillerden meydana gelen, un pigmentlerini ağartmak veya beyazlatmak için kullanılmaktadır.

Benzoil peroksit'le ilk kanserojenite çalışması 1955 yılında yapılmıştır. Oppenheimer (1955), bu çalışmada farelere % 0,5, % 2, % 3 Benzoil peroksit içeren hapları deri altına implante etmiş, Benzoil peroksit'in tümör oluşturmadığını saptamıştır.

Bir başka araştırmada Van Duuren ve ark (1963), Swiss-Millerton farelerine 42 hafta boyunca haftada 3 kere 5mg Benzoil peroksit'i deriye sürmüşler, bu dozda Benzoil peroksit'in tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Saffiotti ve ark (1962), Swiss farelerine 80 hafta boyunca haftada 2 kere % 0,5 Benzoil peroksit'in deriye sürülmesinden sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını saptamışlardır.

Sharrat ve ark (1964), 1) erkek albino sıçanlarının (120 hafta) ve albino farelerin (80 hafta) içme suyuna 28, 280 ve 2800 mg/kg dozlarda Benzoil peroksit'i ekleyip; 2) deri altı tek enjeksiyon yapıp (sıçanlar - 120mg ve fareler - 50mg) ve 3) farelere 6 hafta boyunca 25 mg deriye sürüp histopatolojik incelemeler yapmışlar, bu dozlarda Benzoil peroksit'in tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Hueper (1964), Bethesda siyah sıçanlarına 50 mg Benzoil peroksit içeren jelatin haplar deri altına implante edildikten 96 hafta sonra implantasyon bölgesi veya başka hiçbir bölgede tümör olmadığını göstermiştir.

Poirier ve ark (1967), Charles River CD sıçanlarına 12 hafta boyunca haftada 2 kere 2,9 mg/kg deri altı tek enjeksiyon yaptıktan sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Maya geri mutasyon testinde ve Salmonella testinde S9 mix varlığında ve yokluğunda Benzoil peroksit'in genotoksik olmadığı bulunmuştur (Bionetics, 1975: Kraus ve ark. 1995'den).

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Yamaguchi ve Yamashita (1980), *Salmonella* testinde S9 mix varlığında ve yokluğunda Benzoil peroksit'in genotoksik risk taşımadığını bulmuşlardır.

Slaga ve ark (1981), SENCAR farelerine 52 hafta boyunca haftada 2 kere 1, 10, 20, 40 mg Benzoil peroksit deriye sürüldükten sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Birnboim (1983), insan beyaz kan hücrelerinde Benzoil peroksit'in DNA'da tek zincir kırığına sebep olduğunu saptamıştır.

Gensler ve Bowden (1983), Benzoil peroksit'le muamele edilmiş JB6 epidermis hücrelerinde DNA tek zincir kırılmalarını saptamışlardır.

Deflora ve ark (1984), *Salmonella* genotoksisite testinde S9 mix varlığında ve yokluğunda Benzoil peroksit'in genotoksik olmadığını, *E.coli* bakterilerinde DNA tamirini S9 mix varlığında negatif olarak, S9 mix yokluğunda pozitif olarak etkilediğini belirlemişlerdir.

Kurokawa ve ark (1984), SENCAR farelerine 52 hafta boyunca haftada 2 kere 20 mg Benzoil peroksit deriye sürüldükten sonra karsinoma oluşması tespit etmişlerdir.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Järventaus ve ark. (1984), Benzoil peroksit'in genotoksik etkisini belirlemek için CHO hücrelerinde, kardeş kromatid değişimi (KKD) testini kullanmışlar, S9 mix varlığında KKD'nin uyarıldığını saptamışlardır.

Ishidate ve ark (1984), CHL hücrelerinde Benzoil peroksit'in kromozom anormallliği oluşturmadığını ve Salmonella testinde S9 mix varlığında ve yokluğunda genotoksik risk taşımadığını bulmuşlardır.

Hartley ve ark (1985), BALB kültürleri ve normal insan c-keratinosit kültürlerinde, Benzoil peroksit'in DNA tek zincir kırılmalarına sebep olduğunu ve sitotoksik olduğunu saptamışlardır.

Saladino ve ark (1985), normal insan bronş epitel hücre kültürlerinde, Benzoil peroksit'in sitotoksik olduğunu ve DNA tek zincir kırıkları oluşturduğunu saptamışlardır.

Iversen (1986), Tüysüz Oslo farelerine 58 hafta boyunca haftada 2 kere %5 Benzoil peroksit'i deriye sürmüş ve bu dozda Benzoil peroksit'in tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuştur.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Matula ve ark. (1987), E.coli SOS testinde genotoksik risk taşımadığını, ancak *Salmonella* testinde S9 mix yokluğunda genotoksikken, S9 mix varlığında genotoksik olmadığını belirlemişlerdir.

Hergenahn (1987), NMRI farelerine 16 ve 24 hafta boyunca haftada 2 kere 20 ve 40 mg Benzoil peroksit'in deriye sürülmesinden sonra bu dozda tümör-başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuştur.

Schweizer ve ark (1987), Sibirya altın hamsterlere 64 hafta boyunca haftada 3 kere 160 mg Benzoil peroksit'i deriye sürmüşler, bu dozda Benzoil peroksit'in tümör başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Swierenga ve ark. (1987), T51B mutasyonu, hepatositlerde DNA tamiri ve V79 hücrelerinde kardeş kromatid değişimi testlerinde S9 mix yokluğunda genotoksik olduğunu aynı zamanda T51B epitel hücrelerinde kullanılan dozların sitotoksik olduğunu ve DNA tek zincir kırıkları oluşturduğunu saptamışlardır.

Iversen (1988), SENCAR farelerine 52 hafta boyunca haftada 2 kere %5 Benzoil peroksit'in deriye sürülmesinden sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuştur.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, NTP (ABD Ulusal Toksikoloji Programı) (1990), çerçevesinde yapılan bir çalışmada SENCAR farelerine 26 hafta boyunca haftada 1 kere 20 mg Benzoil peroksit deriye sürülmüş, bu dozda Benzoil peroksit'in tümör başlatıcı etkisinin olmadığı saptanmıştır.

Athar ve ark (1990), SENCAR farelerine 26 hafta boyunca haftada 2 kere 20 mg Benzoil peroksit deriye sürüldükten sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Gimenez-Conti ve ark. (1993), SENCAR farelerine 100 hafta boyunca haftada 2 kere 0.1, 0.3, 0.6, 2 ve 20 mg Benzoil peroksit'in deriye sürüldükten sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör başlatıcı etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, NTP (ABD Ulusal Toksikoloji Programı) (1994), çerçevesinde yapılan çalışmada Swiss (CD-1) farelerine ve B6C3F1 farelerine 52 hafta boyunca haftada 1 kere 20 mg Benzoil peroksit deriye sürülmüş, sonra bu dozda Benzoil peroksit'in tümör başlatıcı etkisinin olmadığı saptanmıştır.

2.2. Klor İle Yapılmış Kanserojenite, Toksisite ve Mutajenite Çalışmaları

Klor; unların, kek üretiminde olduğu gibi, özel amaçlar için muamelesinde, bisküvi ve kraker unlarında ise sulu hamurun akış karakteristiklerini, yayılmayı ve üretilen bisküvi çapını kontrol etmekte kullanılmaktadır.

Un değirmenlerinde aynı zamanda, mikrobiyal bulaşmayı azaltmanın bir yolu olarak, öğütme öncesi buğdayı tavlama için kullanılan suya klor ilave edilmektedir. Bu durum tipik olarak düşük küf ve bakteri sayısı ile sonuçlanmaktadır.

Klorun un proteinlerini diğer okside edici maddelerin etkisine benzer yolla okside ettiği kabul edilmektedir. Kükürt içeren amino asitleri modifiye etmesine ilaveten, klor aynı zamanda proteinler ve doymamış yağ asitleri ile de kombinasyona girmektedir.

İngiltere Sağlık Bölümü'nün 1996'da yayınladığı Gıda, Tüketici Ürünleri ve Çevredeki Kimyasalların toksisite, mutajenite, kanserojenitesi üzerinde hazırlanan raporuna göre, 90 gün boyunca klorlanmış undan yapılmış kekler verilen sıçanlarda hiçbir toksikolojik sonuç bulunamamıştır. Fakat, Klor içeren maddelerin böbrek üstü yağlarda biriktiği saptanmıştır (<http://www.archive.official-documents.co.uk/document/doh/toxicity/toxic.htm>).

2.3.Klor Dioksit İle Yapılmış Kanserojenite, Toksisite ve Mutajenite Çalışmaları

Klor dioksit ağartma etkisine sahip olmakla birlikte bu etki Benzoil peroksit ile kıyaslandığında nispi olarak azdır.

İngiltere Sağlık Bölümü'nün 1996'da yayınladığı Gıda, Tüketici Ürünleri ve Çevredeki Kimyasalların toksisite, mutajenisite, kanserojenite üzerinde çalışan Komitelerin raporunda, Klor dioksit'in bakterilerde gen mutasyonlarına ve farelerde oral olarak değil, sadece karın zarına enjekte edildiğinde (i.p.) kromozom hasarına ve mikronukleus oluşumuna sebep olduğu *Salmonella*, BA13 (ARA testi) ve *E. coli*'de DNA hasarı için Pol testi ve fare lenfoma L5178Y TK+/- testlerine göre Klor dioksit'in mutajenik olmadığı belirtilmiştir

(<http://www.archive.official-ddocuments.co.uk/document/doh/toxicity/toxic.htm>).

2.4. Potasyum Bromat İle Yapılmış Kanserojenite ve Genotoksisite Çalışmaları

Genel bir hamur geliştirici olarak uzun bir kullanım geçmişi olan Potasyum bromat ilk olarak maya gıdasının bir bileşeni şeklinde sunulmuş ve 1980'li yılların ortalarına kadar, en etkili oksidant madde olarak kullanılmıştır. Günümüzde de kullanımına devam edilmektedir.

Potasyum bromat yavaş etki eden ve düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta aktif olmaya başlayan okside edici bir madde olduğundan etkisini son fermantasyonun ileri aşamalarında ve pişirme işleminin başında göstermektedir. Bromat sistein'in sülfidril gruplarını molekül içi ve moleküller arası disülfid bağlarına çevirerek bağımsız protein konformasyonlarını stabilize eder ve bitişik, komşu protein molekülleri arasında bağlar oluşturur. Bu değişimin sonucu olarak da hamura daha fazla dayanıklılık kazandırır (Kamman ve ark 1984 ve Pyler ve ark. 1994: Boyacıoğlu, 1998b'den).

Kurokawa ve ark. (1983), F344 sıçanlarının içme suyuna 250 ve 500 ppm dozlarda Potasyum bromat ilave etmişler ve sıçanlarda 110 hafta sonra böbrek

tümörlerinin varlığı için histopatolojik incelemeler yaparak Potasyum bromat'ın F344 sıçanlarında kanserojenik olduğunu saptamışlardır.

Kurokawa ve ark (1985), erkek F344 sıçanlarının içme suyuna 500 ppm N-etil-N-hidroksietilnitrosamin (EHEN) ile 2 hafta boyunca kanserleşmeyi uyardıktan sonra 15, 30, 60, 125, 250 ve 500 ppm Potasyum bromat verilerek etkisini araştırmışlar, 30 ppm'den fazla doz almış sıçanlarda önemli derecede tümör artışı saptamışlardır.

Kurokawa ve ark (1986b), erkek F344 sıçanlarının içme suyuna 15, 30, 60, 125, 250 ve 500 ppm dozlarda Potasyum bromat'ı 104 hafta boyunca ilave ederek, uzun vadeli düşük dozların böbrek tümörleri üzerindeki etkisini histopatolojik incelemeler yaparak araştırmışlar, 125, 250 ve 500 ppm dozlarında doza bağlı olarak böbrek tümörlerini oluşturduğunu saptamışlardır.

Kurokawa ve ark (1986a), F344 sıçanlarının ve B6C3F1 farelerinin içme suyuna 250 ve 500 ppm dozlarda Potasyum bromat ilave etmişler ve 110 hafta sonra böbrek tümörlerinin varlığı için histopatolojik incelemeler yapılarak uzun vadeli kanserojenite testi yapmışlardır. Ayrıca dişi farelere de 500 ve 1000 ppm dozunda Potasyum bromat'ı 78 hafta boyunca vermişlerdir. Sonuçta dişi farelerde tümör oluşumu görülmezken, Potasyum bromat'ın hem erkek hem dişi sıçanlarda kanserojenik olduğunu saptamışlardır.

Kurokawa ve ark (1987), erkek F344 sıçanlarının içme suyuna 500 ppm Potasyum bromat'ı 104 hafta boyunca ilave ederek Potasyum bromat'a maruz kalma süreci ile böbrek tümörleri oluşması arasındaki ilişkiyi histopatolojik incelemeler yaparak araştırmışlardır. Araştırmacılar, böbrek adenomaların oluşması için bu çalışmada yapılan şartlar altında 26 haftanın geçmesi gerektiğini, bu adenomaların tetiklenmesi için sıçanların en az 13 hafta boyunca Potasyum bromat'a maruz kalmaları ve toplam dozun 4 g/kg olması gerektiğini belirlemişlerdir.

Hayashi ve ark (1988), erkek ddY farelerine 0-400 mg/kg dozunda Potasyum bromat'ı intraperitoneal olarak vererek yaptıkları mikronukleus testi sonucunda mikronukleus oluşumunu saptamışlardır.

Sai ve ark (1991), erkek F344 sıçanlarına intraperitoneal olarak 70 mg/kg dozunda Potasyum bromat ve antioksidant maddeler verildikten sonra 8-

hidroksiguanozin miktarları (8-oxo-dG), lipid peroksidasyonu (LP) dereceleri ve böbrek ağırlıklarında artışlar saptamışlardır.

Kurata ve ark (1992), F344 sıçanlarına intragastrik (mideye verme) olarak maksimum doz 300 mg/kg Potasyum bromat tek doz verildikten sonra nefropati belirtileri için bakılmış, 104 hafta sonra tek doz verilmiş sıçanlarda böbrek kanseri görülmediğini belirlemişlerdir.

Sai ve ark (1992a), Potasyum bromat'ın böbreklerde oluşturduğu oksidatif DNA hasarına karşı antioksidant maddelerin koruyucu rollerini erkek F344 sıçanlarına intraperitoneal (karın zarına enjeksiyon) olarak 80 mg/kg Potasyum bromat ve antioksidant maddeler verildikten sonra 8-hidroksideoksiguanozin (8-oxo-dG) miktarlarını araştırmışlar, glutatyonun (800 mg/kg), sisteinin (400 mg/kg) intraperitoneal olarak ve 5 gün boyunca, vitamin C'nin 200 mg/kg intragastrik olarak verilmesinin 8-oxo-dG miktarında azalmaya sebep olduğunu, 0,3 ml/kg dietilmaleat'ın intraperitoneal olarak verilmesi ile 8-oxo-dG artışın olduğunu, 18.000 U/kg lipozom kaplanmış superoksid dizmutaz intraperitoneal olarak ve 5 gün boyunca vitamin E intragastrik olarak verildiğinde bir etki görülmediğini saptamışlardır.

Sai ve ark (1992b), Potasyum bromat ile F344 sıçan kan hücrelerinde mikronukleus indüklenmesi ve antioksidantlar ile mikronukleus oluşumunun önlenmesini araştırmışlardır. İntraperitoneal olarak 60 mg/kg Potasyum bromat verildikten 0.5 saat önce ve sonra intraperitoneal olarak 80 mg/kg glutatyon, 400 mg/kg sistein, 18.000 U/kg lipozom kaplanmış superoksid dizmutaz, 5 gün boyunca 200 mg/kg/gün vitamin C intragastrik olarak ayrıca 4. gün 60 mg/kg Potasyum bromat intraperitoneal olarak verilmiştir. Glutatyon, sistein ve lipozom kaplanmış superoksid dizmutaz verilen sıçanlarda mikronukleus oluşmasının önemli derecede önlendiğini, vitamin C'nin mikronukleus oluşumunu önleyici etkisinin olmadığını saptamışlardır.

Umemura ve ark (1993), içme suyuna 2 hafta boyunca 500 ve 1750 ppm Potasyum bromat verilen sıçanların böbrek dokuları üzerinde mikroskopik incelemeler yaparak, böbrek ağırlıklarını ölçerek ve böbrek hücrelerinin bölünme indeksini ölçerek araştırmışlar, Potasyum bromat verildikten sonra erkek sıçanların

böbreklerinde hyalin damlacıkları saptamışlar ve hücre bölünmelerinde artış belirlemişlerdir. Aynı sonuçlar dişi sıçanlarda görülmemiştir.

Cho ve ark (1993), Sprague-Dawley sıçanlarına intraperitoneal olarak 500 mg/kg Potasyum bromat verildikten sonra böbrek ve karaciğer preparatlarına HPLC-ECD analizi yaparak 8-hidroksiguanin miktarlarındaki artışın karaciğere nazaran böbreklerde daha çok olduğunu saptamışlardır.

Sai ve ark (1994), Potasyum bromat'ın F344 sıçanlarının böbrek hücrelerinde, zamana ve doza bağlı olarak tümör oluşturmalarını, 8-oxo-dG miktarlarını ölçerek araştırmışlar, 0,5-5 mM dozlarından sonra 8-oxo-dG miktarının önemli derecede arttığını bulmuşlardır.

Umemura ve ark (1995), Potasyum bromat ile kanserojenekte oksidatif stresin rolünü fare ve sıçanların içme suyuna 30 hafta boyunca 100, 200, 400 ve 500 ppm Potasyum bromat ekleyerek 8-oxo-dG miktarlarını belirleyerek araştırmışlar, 8-oxo-dG'nin 200 ve 400 mg/kg dozlarında önemli derecede arttığını saptamışlardır.

Lee ve ark (1996), intraperitoneal olarak tek doz 80 mg/kg ve 160 mg/kg Potasyum bromat verildikten sonra böbrek ve karaciğerdeki oh8Gua glikosilaz enziminin aktivitesini ölçmüşler, doza ve zamana bağlı olarak oh8Gua glikosilaz enziminin aktivitesinde artışın sadece böbreklerde görüldüğünü, bu enzim oksidatif stres sonucu oluşan 8-hidroksiguanin'lerin tamirinden sorumlu olduğunu ve E.coli bakterilerinde de oksidatif stres sebebiyle aktivitesinin arttığını saptamışlardır.

Umemura ve ark (1998), Potasyum bromat'tan kaynaklanan 8-oxo-dG oluşma kinetiğinin, F344 sıçanlarının içme suyuna 1, 2, 3, 4 ve 13 hafta boyunca 500 ppm Potasyum bromat verildikten sonra hızla yükseldiğini saptamışlardır.

Wolf ve ark (1998), Potasyum bromat'ın zamana ve doza bağlı olarak tümör oluşturmalarını 12, 26, 52, 78 veya 100 hafta boyunca içme suyuna 0, 0.02, 0.1, 0.2 ve 0.4 g/L Potasyum bromat ilave edildikten sonra araştırmışlar ve makroskopik incelemeler sonucunda böbrek tümörlerinin ancak 52 hafta sonra yüksek doz almış sıçanlarda saptandığını, tiroid folikül tümörlerinin ise 26 hafta sonra 0.1 ve 0.2 g/L gruplarında sadece 1 sıçanda görüldüğünü bildirmişlerdir.

DeAngelo ve ark (1998), Potasyum bromat'ın kanserojenik ve kronik toksik etkilerini erkek B6C3F1 farelerinin içme suyuna 0, 0.08, 0.4 veya 0.8 g/L dozlarda

ve F344/N sıçanlarının içme suyuna 0, 0.02, 0.1, 0.2 ve 0.4 g/L Potasyum bromat'ı 100 hafta boyunca ilave ederek dokuların makroskopik incelemelerini yapmışlar, Potasyum bromat'ın sıçanların böbrek, tiroid ve mezotelyumlarında ve erkek farelerin böbreklerinde kanserojenik olduğunu bulmuşlar, kanserojenik etkinin 0.02 g/L (20 ppm; 1,5 mg/kg/gün) dozu kadar düşük bir dozda da görüldüğünü belirtmişlerdir.

Cadenas ve Barja (1999), F344 sıçanlarında 80 mg/kg vücut ağırlığı dozundaki Potasyum bromat'la oluşturulan oksidatif DNA hasarları üzerinde resveratrol, melatonin, vitamin E ve PBN (alfa-fenil-N-tert-butyl)'in azaltıcı etkisini 8-oxo-dG miktarını ölçerek araştırmışlardır. Bu çalışmada Potasyum bromat'tan dolayı 8-oxo-dG miktarındaki % 100 artış resveratrol uygulamasıyla tamamen, melatonin, vitamin E ve PBN'in uygulanmasıyla ise kısmen ortadan kalktığını saptamışlardır.

Giri ve ark (1999), Potasyum bromat'ın 50, 75 ve 125 mg/kg dozlarını erkek Wistar sıçanlarına intraperitoneal olarak verilmesinden sonra DNA sentezinde doza bağlı artış saptamışlardır.

Parsons ve Chipman (2000), Potasyum bromat'ın genotoksitesini 5 mM dozda insan akyuvarlarında ve 1,5 mM dozda NRK-52E sıçan böbrek epitel hücrelerinde komet testi ile araştırmışlar ve dana timüs DNA'sında 8-oxo-dG miktarlarını ölçmüşlerdir. İnsan akyuvarlarında 5 mM, NRK-52E sıçan böbrek epitel hücrelerinde 1,5 mM dozlarında DNA zincir kırılmalarında ve dana timüs DNA'sında 8-oxo-dG miktarında artış saptamışlardır.

Crosby ve ark (2000), F344 sıçan mezotel hücrelerinde 6 mM dozdaki Potasyum bromat'ın oksidatif stres proteinlerinin sentez miktarları üzerindeki etkisine Potasyum bromat'a maruz kalmış hücrelerin protein analizini yaparak araştırmışlar, mitotik indeks ile birlikte apoptotik indeksi belirlemişler ve HO-1 proteininin hücredeki yerleşimine bakarak stres ile alakalı proteinlerin ifadesinin arttığını saptamışlardır.

Shiao ve ark (2002), içme sularına 2 sene boyunca 0,2-0,4 g/L Potasyum bromat ilave edilen F344 sıçanlarının böbrek hücrelerindeki Von Hippel-Lindau (VHL) geni üzerindeki Potasyum bromat'ın mutajenik etkisini polimeraz zincir

reaksiyonu, tek zincir konformasyon polimorfizmi tekniği, DNA baz sırası belirlemesi tekniği kullanarak ve ayrıca dokuların mikroskopik incelemeleriyle araştırmışlar, VHL geninde sadece bir mutasyon bulmuşlardır.

Harrington-Brock ve ark (2003), L5178Y/T_k (+/-)-3.7.2C fare lenfoma hücrelerinde 0.6-3 mM Potasyum bromat'ın farelerin T_k (timidin kinaz) geni üzerindeki mutajenik etkisini fare lenfoma testiyle araştırmışlar, mutasyon frekansını 0,6 mM'de 100×10^{-6} ve 3 mM'de 1300×10^{-6} olarak bulmuşlardır.

Arai ve ark (2003), Mmh/Ogg1 geninden yoksun farelere 12 hafta boyunca 2 g/L Potasyum bromat vererek 8-hidroksiguanin miktarları yüksek olan hücrelerin bölünme kapasitelerini ve bölünen hücrelerde mutasyon frekansı üzerindeki etkisini karaciğer DNA'sında 8-hidroksiguanin miktarlarının artışı ölçerek araştırmışlardır. Araştırmacılar, 8-hidroksiguaninlerin tamirinden sorumlu MMh/Ogg1 geninden yoksun farelerde 8-hidroksiguanozin miktarlarının 26.1 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır.

Umemura ve ark (2004), F344 sıçanlarında potasyum bromat'ın böbrek kanserojenezis üzerindeki etkisini 30 mg/kg intragastrik, 80 mg/kg intraperitoneal ve 4 hafta boyunca içme suyuna 0, 15, 30, 60, 125, 250 ve 500 ppm dozlarda verilerek tiobarbiturik asit (TBARS) tepkisel maddelerin artışı, 8-oksodeoksiguanozin (8-oxo-dG) miktarlarını ölçerek ve Bromodeoksi uridine boyama endeksi (BBE) testi yapılarak araştırmışlardır. İntra gastrik ve intraperitoneal olarak verilen dozlarda önemli derecede yüksek TBARS ve 8-oxo-dG görülürken, içme suyuna verilen dozlarda tiobarbiturik asit (TBARS) artışı görülmemiş, 8-oxo-dG miktarı da artmıştır. Ayrıca erkek sıçanlarda 30 ppm, dişi sıçanlarda 250 ppm ve yukarısında yüksek BBE saptamışlardır.

Khan ve Sultana (2004), Wistar sıçanlarında soya izoflavonlarının Potasyum bromat'ın oksidatif stres etkisi üzerine etkilerini araştırmak için intraperitoneal olarak 125 mg/kg potasyum bromat ve oral olarak 5 ve 10 mg/kg soya izoflavonları verildikten sonra DNA sentezi düzeylerinde önemli derecede azalma saptamışlardır.

2.5. Potasyum İyodat İle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Hızlı okside edici madde olarak unun kuvvetlendirilmesinde kullanılan beyaz, kristal toz formda, hafif bir kokuya sahip olabilen Potasyum iyodat'ın un proteinleri üzerindeki oksidasyon etkisinin, esas olarak diğer okside edici maddelerin neden olduğu etkiye benzer olduğu kabul edilmektedir. İlave olarak, bazı tuz veren bileşenlerin oluşumu beklenilmektedir. Temel kalıntı iyodid olmakla birlikte bir kısım iyodat da mevcut olabilmektedir.

Parsons ve Chipman (2000), Potasyum iyodatın *in vitro* koşullarda DNA oksidasyonuna sebep olmadığını tespit etmişlerdir.

Poul ve ark (2004), Potasyum iyodat'ın genotoksik etkisini CHO hücrelerinde komet ve mikronukleus testlerini kullanarak araştırmışlardır. Bu araştırmada 10 mM dozundaki Potasyum iyodat'ın genotoksik olmadığı saptanmıştır.

2.6. Propionik Asit İle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Propionik asit düşük molekül ağırlıklı bir yağ asidi olup, ekmek üretiminde kullanıldığında küf ve rope gelişimini yani ekmekte genellikle sporlarının ısıya daha dirençli olması nedeniyle (Rosenkvist ve Hansen, 1995: <http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm>'den) *Bacillus subtilis* (*Bacillus mesentericus*) bakterisinin gelişmesi sonucunda ortaya çıkan (ICMSF, 1998: <http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm>'den) ekmeğin iç kısmındaki proteinlerin ve nişastaların birbirinden ayrılmasıyla, ekmek parçalandığı zaman, yapışkan, yumuşak madde hastalığının ismini simgeleyen berrak ip benzeri lifler halinde görülmesine neden olan bir hastalığı (<http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm>) önleyen veya geciktiren, propiyonatların temelini oluşturmaktadır. Asidin kendisi, kapalı bir soğutma tüneline ekmeğin yüzeyinde aerosol olarak uygulandığında, küf önleyici olarak kullanım alanı bulmaktadır (Pyler, 1994: Boyacıoğlu, 1998b'den).

Griem (1985), sıçanlara 20 hafta boyunca yiyeceklerine % 0,4 ve % 4 Propionik asit ilave edildikten sonra mide-öncesi bölgede tümör oluştuğunu

göstermiştir. Bu bölgenin insanlarda bulunmamasına rağmen gırtlak ve mide borusu benzer epitel hücrelerinden oluştuğu için Propionik asit'in insan beslenmesinde bulunmasının tehlikesi göz ardı edilemez.

2.7. Sodyum Propiyonat İle Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Sodyum propiyonat, Propiyonik asit'in sodyum tuzu olup ekmekte etkili bir küf önleyici olarak kullanılmaktadır. Sodyum propiyonat ekmeğin küflenmesizin raf ömrünü bir kaç gün daha uzatabilmektedir.

Sugihara ve ark (1997), alfa-linolenik asit ile dolmuş ve normal sıçan hepatositlerinin ortamına Sodyum propionat ilave ederek lipid peroksidasyonu ve çıkan Laktat Dehidrojenaz (LDH) seviyelerini incelemekle, Sodyum propiyonat'ın sitotoksik etkisinin olmadığını göstermişlerdir.

3. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada materyal olarak sigara içmeyen yakın yaşlardaki iki erkek (25 ve 26 yaşlarında), iki bayandan (25 ve 26 yaşlarında) alınan periferik kan ve test maddesi olarak da Potasyum bromat kullanılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Potasyum Bromat

3.1.1.1.(1). Potasyum Bromat'ın Kullanım Alanları

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Potasyum bromat'ın (KBrO_3) en önemli kimyasal özelliği kuvvetli bir oksidant olmasıdır. Okside etme derecesi 5.1 olarak belirlenmiştir. Maddeleri okside ettikten sonra kendisi indirgenir ve inaktif bir bileşik olan Potasyum bromür'e (KBr) dönüşür (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>).

Su dezenfeksiyonu için önceleri kullanılan klor yerine, mikropları öldürmede daha etkili olduğu için ve yan ürün olarak kanserojenik trihalometanları çok daha düşük derecelerde oluşturduğundan ozon kullanımı önerilmiştir. Ozon kullanımı, yüksek miktarlarda brom içeren yüzey sularında hipobromik asit oluşmasına ve bromorganik yan ürünler ile de bromat oluşumuna neden olmaktadır (DeAngelo ve ark. 1998).

Genel bir hamur geliştirici olarak uzun yıllardır kullanılan Potasyum bromat ilk olarak maya gıdasının bir bileşeni şeklinde sunulmuş ve 1980'li yılların ortalarına kadar, en etkili oksidant madde olarak çok yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Bu zamana kadar, toksik bir madde olan Potasyum bromat'ın pişirme işlemi sırasında zararsız bir madde olan bromit formuna dönüştüğü kabul edilmekteydi. Bu tarihlerde başlayan, pişirme işlemi sırasında bromatın tamamen bromite dönüşmediği ve

ekmekte kalıntı bromat bulunabileceği tartışmalarının sonucu olarak ABD'nin Gıda ve İlaç Bakanlığı, kullanılabilen Potasyum bromat dozunu 1991'de 75 ppm'e düşürmüş ve daha sonra bu oranın 50 ppm'e indirilmesi konusunda tartışmalar devam etmiş (Boyacıoğlu, 1998b), 1998'de bir araştırma sonrasında bu rakamlar ekmek için 30 ppm'e kadar düşürülmüştür (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>).

Son zamanlara kadar hem ekmek sanayi hem de yasal kurumlar için başlıca problem, ekmekte Potasyum bromat kalıntısının olup olmadığını kesin olarak ölçecek uygun bir metodun olmamasıydı. Böyle bir test yöntemini geliştirmek amacıyla İngiltere'de araştırma laboratuvarında daha önce yapılan çalışmalar ekmekte kalıntı bromat olduğunu göstermiş ve bu bulguların uluslararası kararları etkilemiş olabileceği belirtilmiştir. Sonuçları 1994 yılında yayınlanan bir çalışmada, Japonya'da "Yamazaki Baking Company" deki gıda bilimcilerin geliştirdikleri Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemiyle 3 ppb (mikrogram/kg) tayin limitine kadar bromatı tayin ettikleri ve ekmekte kalıntı bromatın varlığını açıklamışlardır. Benzeri bir yöntem aynı zamanda, İsrail'de "Dead Sea Bromine Group" taki araştırmacılar tarafından da geliştirilmiştir (Boyacıoğlu, 1998b).

Yukarıda belirtilen gelişmelerin sonucu olarak ekmek yapımında Potasyum bromat'ın kullanımı, dünyanın birçok ülkesiyle birlikte A.B.D.'nin bazı eyaletlerinde de yasaklanmış, diğer bazı eyaletlerinde de tüketicinin duyarlılığı dikkate alınarak ekmek üreticileri tarafından kullanılmamaya başlanmıştır (Boyacıoğlu, 1998b).

Tüm bu gelişmelere karşın, Amerikan ekmek sanayi tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, belirli işlem parametrelerinin uygulanmasıyla ekmek yapıldığında bromatın tamamen bromite dönüştüğü ve 3 ppb tayin duyarlılığında tayin edilebilen hiçbir bromat kalıntısı olmayacak şekilde Potasyum bromat kullanımıyla ekmek yapılabileceği belirtilmiştir (Cogswell ve ark, 1997).

ABD'nin Gıda ve İlaç Bakanlığı en son olarak kullanılabilen Potasyum bromat dozunu 0.02 ppm olarak belirlemiştir. Yapılan endüstri çalışmalarına göre 0.02 ppm dozunda kullanıldığı zaman, fırından çıkan ekmekte saptanabilen düzeyde bromat yoktur (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>).

1993'te Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization) Potasyum bromat'ın onaylanmış gıda katkı maddeleri listesinden (Codex Alimentarius) çıkarılmasını önermiştir. Bu rapora dayanarak bir çok ülke bu yasağın uygulamasını başlatmıştır. Fakat, daha sonra bazı ülkeler, 0.005 ppm dozlarının kullanımına izin çıkarmıştır (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>; <http://www.keymix.com/bromate.htm>).

Potasyum bromat gıda katkı maddesi olarak kullanılmakta (E924) ve kalite artımı için beyazlatıcı ve kuvvetlendirici ajan olarak una eklenmektedir (10-75 ppm). $KBrO_3$ 'ün kuvvetlendirici etkisi hamurun şişip daha büyük hacimlere ulaşmasını sağlamaktadır (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>; <http://www.keymix.com/bromate.htm>).

Potasyum bromat yavaş etki eden ve düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta aktif olmaya başlayan okside edici bir madde olduğundan etkisini son fermentasyonun ileri aşamalarında ve pişirme işleminin başında göstermektedir. Bromat, sistein'in sulfidril gruplarını, molekül içi ve moleküller arası disulfit bağlarına çevirerek bağımsız protein konformasyonlarını stabilize eder ve bitişik, komşu protein molekülleri arasında bağlar oluşturur. Bu değişimin sonucu olarak da hamura daha fazla stabilite kazandırır (Kamman ve ark., 1984 ve Pyler ve ark., 1994: Boyacıoğlu, 1998b'den).

Potasyum bromat çok kolayca tepkimeye girebildiği için, hamurun içine katıldıktan sonra bir kısmı inaktif madde olan Potasyum bromür'e indirgenmektedir. Ayrıca, Potasyum bromür'e indirgenme ekmek yapımı esnasında fırındaki ısı sonucunda da olmaktadır (Kurokawa ve ark., 1990). Fakat, Potasyum bromat'ın tümü Potasyum bromür'e dönüşemediği için, geri kalan miktarların sağlık için tehlikeli olduğu düşünülmüş ve bir çok ülke Potasyum bromat'ı potansiyel kanserojen olarak değerlendirip, yasaklamıştır (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>; <http://www.keymix.com/bromate.htm>).

Ayrıca, Potasyum bromat, kuaförler tarafından saç biçimlendirilmesi için oksidant madde olarak, analitik kimyada brominasyon maddesi olarak, yazıcı

boyalarında ek madde olarak, konserve edilmiş et ve balık ürünlerinde kalite artırıcı olarak kullanılmaktadır. Bromat, ateşlenmeyi ve patlamayı hızlandırmaktadır. Bu özelliği ile gerçekte havai fişeklerin bir bileşenidir (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>; http://www.chemicalland21.com/aro_korhi/industrialchem/inorganic/POTASSIUM%20BROMATE.htm; http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/PO/potassium_bromate.html; <http://www.keymix.com/bromate.htm>).

3.1.1.1.(2). Potasyum Bromat'ın Vücuda Giriş Yolları ve Etkileri

İnsan vücuduna Potasyum bromat doğal olarak; yiyecek ve içeceklerle ağız, tozların buruna dolmasıyla, solunum ve deri olmak üzere 3 yoldan girebilir.

Potasyum bromat ağız yoluyla alındığında gastrointestinal yolları tahriş etmektedir. Semptom olarak mide bulantısı, kusma ve ishal görülmektedir. Karın sancıları, düşük idrar oluşumu, düşük kan basıncı, kanda nitrat vb. bazı maddelerle zehirlenmeyi takiben oluşan methemoglobin bulunuşu (methemoglobinemia), kasılmalar, böbrek ve karaciğer hasarları ve komaya sebep olabilmektedir. Geç semptom olarak morarma (siyanozis) görülebilir. Böbreklerin bozulmasından dolayı 1-2 hafta içerisinde ölüme sebep olabilir. Yaklaşık ölümcül dozu 4 gram'dır.

Solunduğunda solunum borusuna tahriş edici etki yapmaktadır. Semptomatik olarak öksürmeye, nefes darlığına neden olmaktadır.

Deriye tahriş edici etkisi bulunmaktadır. Semptomatik olarak kızarma, kaşınma ve acıya neden olabilir. Nemli ortamlarda, toksik derecelerde deriden emilebilmektedir. Uzun süreli maruz bırakılma deri yanmasına sebep olabilir.

Göz ile temasta kızarma ve acıya sebep veren tahriş edici etkisi vardır. Göz hasarına sebep olabilir. Kronik olarak maruz bırakılınca, böbrek hasarına sebep olabilir. Önceden deri veya göz sorunları bulunduran veya böbrek, karaciğer, solunum fonksiyonlarında sorunu olan bireyler maddenin etkilerine daha hassas olabilirler (<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/p5576.htm>).

Göz, deri ve üst solunum organlarına tahriş edici etki göstermektedir. Solunduğunda nefes alma zorluğu oluşmaktadır. $KBrO_3$ hem nefrotoksin hem ototoksindir. Kardiyotoksikliği ve hepatotoksikliği ile ilgili birçok veri bulunmaktadır (http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/PO/potassium_bromate.html).

Yüksek Potasyum bromat dozlarını denek hayvanlarının içme suyuna uzun süre boyunca (2 sene) eklemekle, kimyasalın kanserojenik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, kanserojenik sonuçlar sıçanlarda görülmesine rağmen, fare ve hamsterlerde görülmemiştir (<http://www.asbe.org/bromate/background.html>).

Potasyum bromat'ın kanser yapıcılığı ve mutajenliği 1986 yılında Uluslararası Kanser Araştırmaları Kurumu (IARC) tarafından değerlendirilmiş ve bu maddenin deney hayvanlarında kanser yapıcılığı için yeterli kanıt var iken, insanlarda kanser yapıcılığı üzerine mevcut hiç veri olmadığına karar verilmiştir. Bu durum esas alınarak, Potasyum bromat Grup 2B; insanlarda muhtemelen kanser yapıcı madde olarak sınıflandırılmıştır.

Potasyum bromat'ın LD_{50} değerleri oral olarak verildiğinde, farelerde; 289 mg/kg, sıçanlarda; 157 mg/kg ve hamsterlerde; 388 mg/kg'dır. İntraperitoneal olarak verildiğinde farelerde; 177 mg/kg, sıçanlarda; 50 mg/kg'dır (http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/PO/potassium_bromate.html).

3.1.1.1.(3). Vücuda Giren Potasyum Bromat'ın Durumu

Potasyum bromat gastrointestinal yoldan hızlı bir şekilde kana emilir ve bir kısmı daha az toksik olan Potasyum bromür'e indirgenir. Daha sonra hem bromat hem bromür böbrekler tarafından atılır. Fakat, böbreklerden atılma esnasında $KBrO_3$ 'ün yüksek konsantrasyonlarının nefron tüplerindeki hücrelere genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Genotoksitesinin serbest oksijen radikallerinin oluşmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Kitto ve Dumars, 1949 ve Kurokawa ve ark, 1990).

3.1.1.1.(4). İnsan Vücudu Üzerine Potasyum Bromat'ın Etkisi

Potasyum bromat'ın yutulmasından çok az süre sonra ortaya çıkabilen yaygın tepkiler mide bulantısı, kusma, karın bölgesinde sancılar ve ishal başlamasıdır.

İnsanlarda LD₅₀ değeri belirlenmemiştir, fakat 50 mg/kg kadar küçük dozlar bile ciddi intoksikasyonlara (zehirlenme) neden olmuştur (Quick ve ark, 1975). Hayvanlardaki LD₅₀ değerleri 160 ve 500 mg/kg arasında değişmektedir (Kurokawa ve ark, 1990).

Potasyum bromat ile iki zehirlenme salgını görülmüştür. Birincisi, ekmek hazırlanışı esnasında yüksek miktarlarda Potasyum bromat'ın ilave edilmesi; ikincisi, bir düğün merasiminde şeker ile Potasyum bromat karışması olarak rapor edilmiştir. Zehirlenmelerin semptomları olarak sindirim sisteminde hafif kasılmalar görülmüştür (Stewart ve ark, 1969 ve Matsumoto ve ark, 1980).

Diğer tüm zehirlenme vakaları saç biçimlendirme malzemelerindeki Potasyum bromat ile alakalı olarak rapor edilmiştir. ABD ve Avrupa'daki vakaların çoğunluğu ve Japonya'daki 2 tane vaka da çocukların yanlışlıkla Potasyum bromat eriyiklerini içmeleri olarak belirtilmiştir. Genelde içilen miktarlar düşük ve semptomlar hafif görülmüştür. Japonya'daki diğer vakaların çoğu ve farklı farklı ülkelerden gelen intihar vakaları ise intoksikasyon ve geri dönülmez zararlar ile sonuçlanmıştır (De Vriese ve ark, 1997).

3.1.1.1.(5). Vücutta Potasyum Bromat Düzeyinin Saptanması

Vücut KBrO₃ düzeyinin rutin olarak saptanması mümkün değildir. Ayrıca, KBrO₃'ün farmakokinetik özellikleri insanlarda yeterince bilinmediği için sadece kan plazması düzeylerinden sonuç çıkarılamamaktadır.

3.1.1.1.(6). Potasyum Bromat'ın Özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan Potasyum Bromat (KBrO₃)(Merck), kristal veya granüler yapıda, tatsız, kokusuz, suda çözünen

(8g/100mL, 20°C), beyaz toz şeklinde bulunmaktadır. İçme suyu pH'sında (~7) tamamen iyonik halde bulunmakla birlikte sulu çözeltilerinin pH'sı nötrdür (<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/p5576.htm>).



Kapalı formülü	: KBrO ₃
Molekül ağırlığı	: 167.01 g/mol
Yoğunluk	: 3.27 g/mL
Kaynama noktası	: 370°C
Erime noktası	: 434 °C
CAS No	: 7758-01-2
Merck Cat No	: 1.04612.0250
Sinonimler	: Bromik Asit; Potasyum Tuzu

(<http://www.chemicaland21.com/arokorhi/industrialchem/inorganic/POTASSIUM%20BROMATE.htm>; <http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/p5576.htm>).

3.1.1.2. Mitomycin C (MMC)

Bu çalışmada pozitif kontrol olarak MMC (KYOWA) kullanılmıştır.

3.1.1.3. Kromozom Medyumu

Biochrom firmasının ürettiği (Cat. No. F 5023) Chromosome Medyum B, hücre kültürü için kullanılmıştır. Chromosome Medyum B'nin her litresinde aşağıdaki bileşimler verilen 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 M.....	2.5 mg

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

3.1.1.4. Kolkisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (Kolşisin = Kolkisin) (Sigma) kullanılmıştır. Kolkisin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 µg/ml) 2.5 ml' lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolkisin'in bazı özellikleri aşağıdadır:

Kapalı formülü	: C ₂₂ H ₂₅ NO ₆
Molekül ağırlığı	: 399.4
Etil asetat içeriği	: %3.4
Kloroform içeriği	: < %0.1
Sigma no	: C-9754

3.1.1.5. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak %0,4'lük KCl (Merck) kullanılmıştır. Eriyik bidestile su içinde stok halinde hazırlanıp ağzı kapalı bir cam kapta buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 1 saat önce yeteri kadar miktar alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.1.6. Fiksatif

KKD ve KA'yı incelemek amacıyla yapılacak olan preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glasial asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3 : glasial asetik asit/metil alkol) ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. MN'leri incelemek amacıyla yapılacak olan preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif ise ilk fiksatif muamelesi için 1 kısım glasial asetik asit, 5 kısım metanol ve 6 kısım %0.9'luk NaCl'nin (1/5/6 : glasial asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) karıştırılması sonucu hazırlanırken, son iki fiksatif, 1 kısım asetik asit' in 5 kısım metanol (1/5 : asetik asit/metil alkol) ile karıştırılması sonucu hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.1.7. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdUrd)

BrdUrd Sigma firmasından (Cat. No. B 5002) temin edilmiştir. BrdUrd eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmıştır. Bu eriyikten 50µl' lik miktarı kültür tüplerine ilave edildiği zaman kültür son konsantrasyonu 10 µg/ml olacak şekilde BrdUrd ihtiva etmektedir.

3.1.1.8. Sorensen Tamponu (Sorensen Buffer)

Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde 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 içinde eritilmiştir (pH=9.3).

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

3.1.1.9. 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 suda eritilmiştir. Daha sonra 21.9 gr sodyum klorür (NaCl) tartılarak yine saf su içinde ve ayrı bir kapta çözülmüştür. Bir şişeye dökülerek iki eriyik iyice karıştırılmış ve üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırladığımız bu stok eriyik 5x SSC' dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. Deneyimizde, bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1x SSC kullanılmıştır.

3.1.1.10. Giemsa

Giemsa boyası Merck firmasından (Cat. No. 9204) temin edilmiş olup deneylerimizde Sorensen tamponu içinde hazırlanmış olan %5'lik boya eriyiği kullanılmıştır.

3.1.1.11. Entellan

Preparat kapatmak için kullanılan yapışkan sıvıdır (Merck, Cat. No. 7961). Preparatlar daimi hale getirilirken kullanılmıştır.

3.1.1.12. Nitrik Asit (HNO_3)

Lamları temizlemek amacıyla 1 N HNO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Plastik şişede saklanarak her defasında tekrar tekrar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları**3.1.2.1. Hassas Terazi**

Hava akımlarına karşı özel cam paravanlarla korunan ve 0,0001 gr hassasiyetindeki GEC AVERY marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.1.2.2. Santrifüj

Rotor çapı 21 cm, 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli HETTICH UNIVERSAL marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.1.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan MICROS marka binoküler ışık mikroskobu preparatların incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

3.1.2.4. İnkübatör

Dedeoğlu marka 0 °C – 100 °C ayarlanabilir inkübatör deneyde hücre kültürünün yapımında ve bazı eriyiklerin 37 °C’ye ısıtılmasında kullanılmıştır.

3.2. Lamların Temizlenmesi

Kültür süresinin bitiminden iki gün önce etiketlenmiş olan lamlar şaleye dizilerek üzerlerini iyice örtecek şekilde 1 N Nitrik asit konmuştur. Şalenin ağzı kapatılarak bu şekilde 24 saat bekletilmiştir. Süre bitiminde lamlar yarım saat akan çeşme suyunda iyice yıkanmıştır. 3-4 defa saf sudan geçirdikten sonra şaleyi saf su ile doldurarak lamlar buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Sterilizasyon

3.3.1. BrdUrd Eriyiğinin Sterilizasyonu

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

3.3.2. Saf Suyun Sterilizasyonu

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

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

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Yine steril şartlarda ve daha önce hazırladığımız BrdUrd eriyiğinden her tüpe son konsantrasyonu 10 µg BrdUrd/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırılmış ve hücre kültürü inkübatörde 37±1°C’de 72 saat için inkübe edilmiştir.

Potasyum bromat suda çözülmüştür. Potasyum bromat’ın etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 ve 48 saat kala son konsantrasyonu 400, 450, 500, 550 µg/ml Potasyum bromat kültür tüplerine ilave edilmiştir. Ayrıca her deneyin bir kontrolü bir de pozitif kontrolü (0,25 µg MMC/ml kültür) vardır.

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolkisin eriyiğinden 50 µl (0.06 µg kolkisin/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C’de) kolkisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm’de (170 × g) 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 karıştırılarak yapılmış olup hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 15 dk. hipotonik eriyikte 37°C’de muamele

edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm’de ($170 \times g$) santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.

Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm’de ($170 \times g$) 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. 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. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamin üzerine 75 cm yükseklikten farklı alanlara 1’er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3 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 ısısında bekletilmiştir.

3.4.2. Preparatların Boyanması ve Daimi Preparatların Hazırlanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını (Sister Chromatid Differentiation=SCD) sağlamak amacıyla Speit (1984), Speit ve Haupter (1985)’in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film şeklinde Sorensen tamponu ile örtülecek şekilde kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B’den alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml’ye tamamlanarak 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. ışınlandırılmıştır.

İşnlama bittikten sonra preparatlar 1x SSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk. inkübe edilmiştir.

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

%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=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1x SSC eriyiğinden alınarak direk olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 20 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. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.5. Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Micros marka binoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede). Bu incelemeler sırasında kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısı ve kromozomal anormallikler belirlenmiştir. Aynı preparatlarda 1., 2., 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin sayısı ve incelenen toplam hücreler içerisinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı saptanmıştır.

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

3.5.1.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücre) saptanmıştır. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirilmiş (Şekil 3.1.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak (Şekil 3.1.b) sayılmıştır. Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3.1.c).

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

Potasyum bromat'ın DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI bulunmuştur.

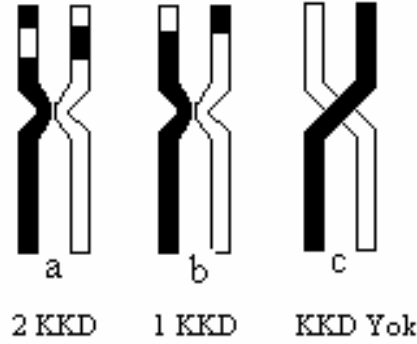
Bunun için tesadüfi seçilmiş 100 hücrenin metafaz kromozomları incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır. Bu verilerden yola çıkarak RI şu şekilde hesaplanmıştır:

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

M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

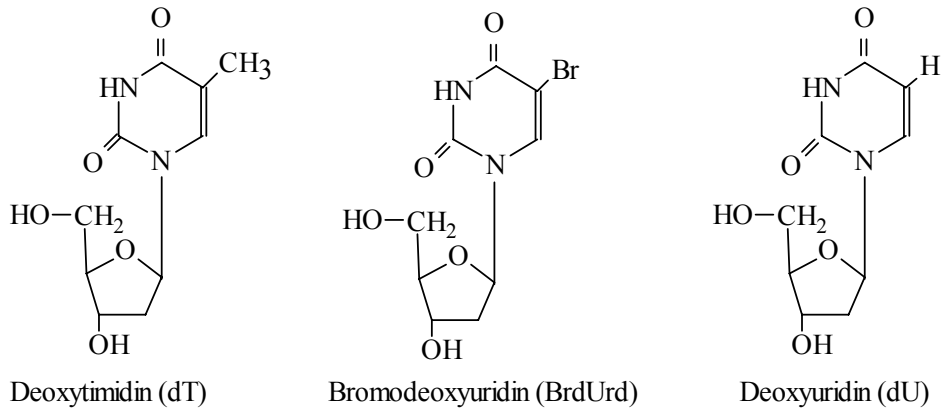
M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı



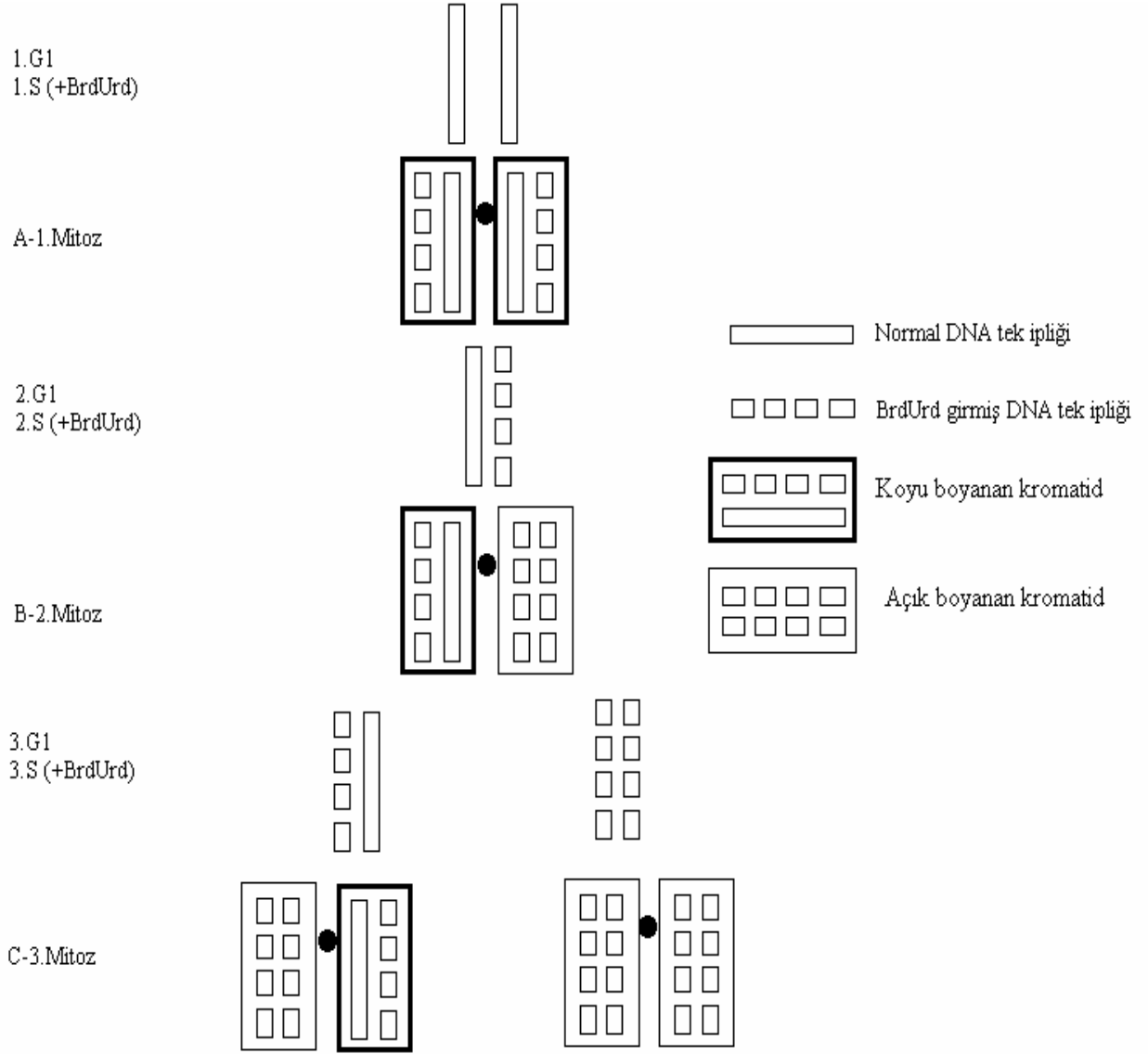
Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit 1990'den).

Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit 1990): BrdUrd, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analoğu olan bileşiklerdir (Şekil 3.2). BrdUrd, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki 5.C atomuna dT'de CH₃, BrdUrd'de Br ve dU'da H atomunun bağlı olmasından kaynaklanmaktadır.

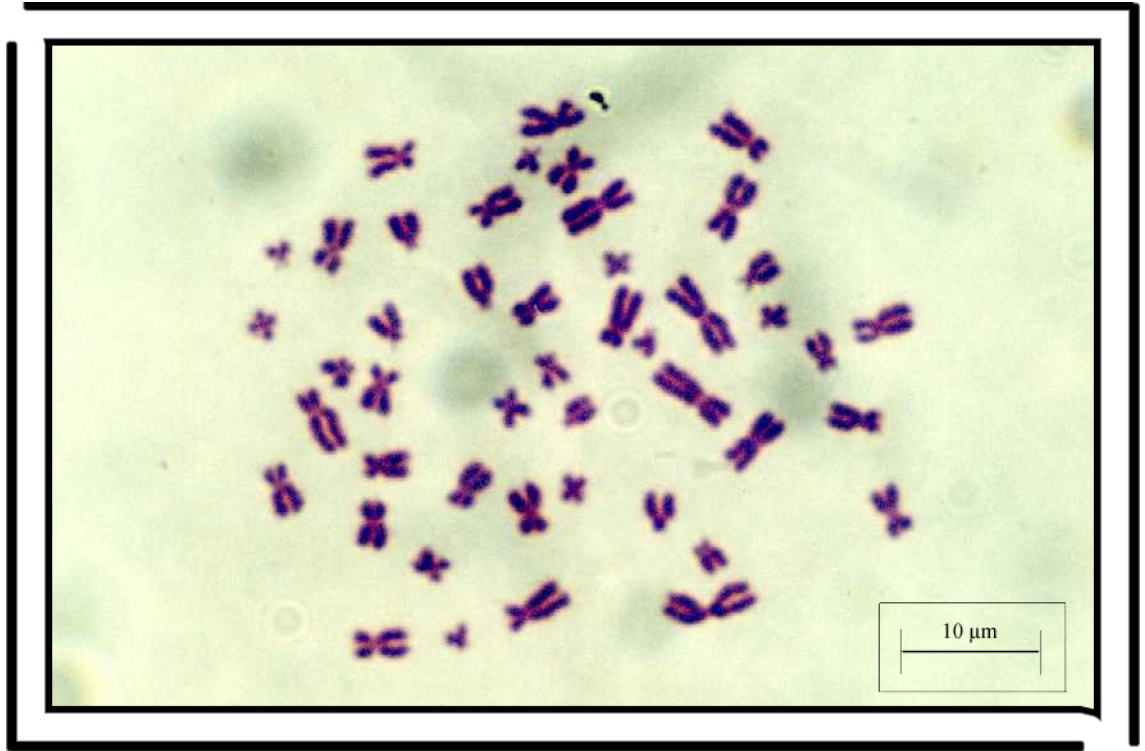


Şekil 3.2. Deoxytimidin (dT), Bromodeoxyuridin (BrdUrd) ve Deoxyuridin (dU)'in kimyasal yapıları.

BrdUrd, DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olduğundan dolayı kültür ortamına BrdUrd koyduğumuzda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliği içine timinin yerine ortamda bulunan BrdUrd'yi alacaktır. Böyle hücrelerinin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdUrd:dT/BrdUrd) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3A; Şekil 3.4). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 2.S fazı) timin ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdUrd yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdUrd) oluşturacaktır. BrdUrd'li ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdUrd girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdUrd ihtiva ettiklerinden (BrdUrd/BrdUrd) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında hücrenin tüm kromozomlarının (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd) kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık renkte boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. (Şekil 3.3B; Şekil 3.5). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdUrd'li ortamda 3.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 renkte boyanacaktır (BrdUrd/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdUrd'li ve diğer kromatidin bir ipliği BrdUrd'li diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom da boyandığında bir kromatidi koyu renkte, bir kromatidi de açık renkte boyanacaktır (dT/BrdUrd:BrdUrd/BrdUrd). İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık, diğer kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücrelerde 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 3.3C; Şekil 3.6). İşte bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre replikasyon indeksi (RI) hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. BrdUrd'nin DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During, 1985: Topaktaş ve Speit 1990'den).



Şekil 3.4. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları. x1000



Şekil 3.5. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları. x1000



Şekil 3.6. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin metafaz kromozomları.x1000

3.5.2. Kromozomal Anormallikler (KA) ve Mitotik İndeksin (MI)

Saptanması

3.5.2.1. Kromozom Yapı ve Sayı Anormalliklerinin Saptanması

Muamele edilmiş ve kontrol kültürlerde her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (4 kişiden toplam 400 hücre) KA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri kaydedilmiştir. İncelenen bu 100 hücre içinde anormal hücreler ile toplam KA sayısı saptanmıştır. Anormal hücrelerin sayısının incelenen hücre sayısına bölünmesi ile anormal hücre yüzdesi ve toplam KA sayısı incelenen hücre sayısına bölünerek de hücre başına düşen KA sayısı (KA/Hücre) bulunmuştur.

Bu çalışmada gap'lar anormallik olarak değerlendirilmemiştir. Gaplar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar 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. İşte bu ölçülere göre gap ve kromatid kırıkları birbirinden ayırt edilmiştir.

3.5.2.2. Mitotik İndeksin (MI) Saptanması

Potasyum bromat'ın mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile mitotik indeks bulunmuştur. Bunun için her seriye ait preparatlardan toplam 3 bin hücre incelenmiş ve bunlar arasındaki metafaz devresinde olan hücreler saptanarak kaydedilmiştir. 3 bin hücre içerisinde metafazların oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks saptanmıştır.

3.6. *In Vitro* Mikronukleus (MN) Testi İçin Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları birbirine yakın iki erkek ve iki bayandan alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına steril şartlarda 6 damla (0.2 ml) (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991) ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde $37\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 68 saat için inkübe edilmiştir (Rothfuss ve ark. 2000).

Potasyum bromat'ın etkisini incelemek için kültür ortamına kültürün başlangıcından 20 ve 44 saat sonra Potasyum bromat'ın daha önce belirlenmiş

konsantrasyonları 400, 450, 500, 550 µg/ml kültür tüplerine ilave edilir. Ayrıca her deneyin 1 kontrolü ve 1 de pozitif kontrolü vardır. İki nukleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de inkübasyonun başlangıcından 44 saat sonra bütün tüplere 8 µg/ml'lik sitokalsin B ilave edilir.

Kültür süresi olan 68. saatin bitiminde kültür tüpleri 1200 rpm'de ($170 \times g$) 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 (% 0.4'lük KCl) ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmış olup hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Aksi halde hücrelerde kümeleşme olmakta ve amaca uygun preparatlar hazırlanamamaktadır. Her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 10 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 15 dk. 1200 rpm'de ($170 \times g$) santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır.

Bu sefer hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif (1/5/6 : glacial asetik asit/metanol/%0.9'luk NaCl) ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 1200 rpm'de ($170 \times g$) 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 2 kere de farklı fiksatifle (1/5 : glacial asetik asit/metil alkol) tekrarlanmıştır. 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. 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 lamlar üzerine 10 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3 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.

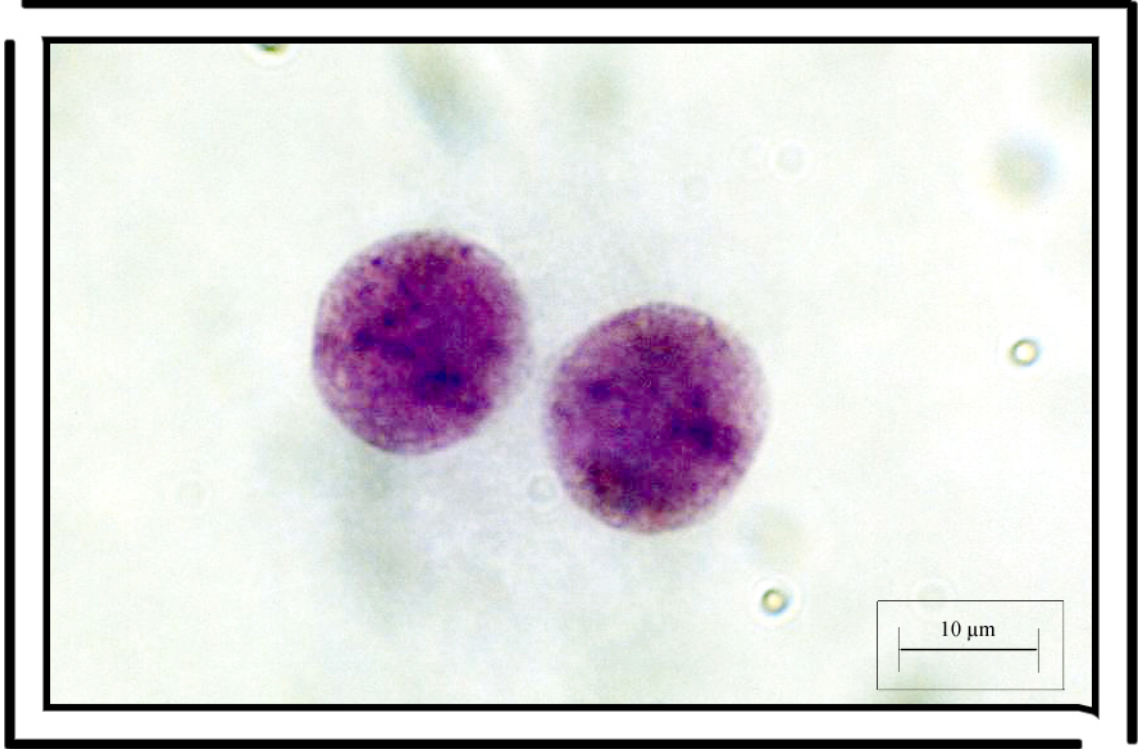
3.6.2. Preparatların Boyanması

%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=6.72). Sonra bu boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzölmüştür. Kuruduğundan emin olunan preparatlar direkt olarak boya içerisine konmuş ve yaklaşık olarak 13 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. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlarda mikroskobik incelemeler yapılmıştır.

3.6.3. Mikroskobik İnceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Micros marka binoküler ışık mikroskobunda 40'lık objektif ile incelenmiştir ($40 \times 10 = 400$ büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 3000 iki nukleuslu hücre (Şekil 3.7) incelenmiş, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronukleus sayısı belirlenmiştir. Mikronukleuslu hücrelerin toplam hücrelere oranlanması ile mikronukleuslu hücre oranı, toplam mikronukleus sayısının incelen hücre sayısına bölünmesiyle de hücre başına düşen MN sayısı (MN/hücre) saptanmıştır.



Şekil 3.7. İki nukleuslu hücre.x1000

3.7. Mikroskopta Fotoğraf Çekme

Fotoğraf çekme işlemi Olympus marka mikroskopta 750 ve 1000 büyütmede yapılmıştır. Daha önce 1., 2., ve 3. mitozu geçiren hücrelerin kromozomlarının, bazı ilginç KA'lara ait örneklerin ve iki nukleuslu hücrelerden mikronukleusa sahip olanlardan birkaç örneğin fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraf çekiminde Kodak marka 100 ASA'lık renkli film kullanılmıştır.

3.8. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Mikroskobik inceleme sonucunda elde edilen KKD, KA, MI, RI ve MN için önce her bir grubun ortalamaları arasında farkın önemli olup olmadığı tek yönlü varyans analiz metoduyla yapılmış, farkın önemli olduğu gruplarda ise muamele edilmiş gruplardan elde edilen sonuçlar ile onların kontrolleri arasındaki farkın önemli olup olmadığı t-testi ile araştırılmıştır.

Muamele edilmiş gruplardan elde edilen kromozomal anormallik içeren hücrelerin yüzdesi ve KA/hücre oranı t-testi metoduna göre kontrolleri ile karşılaştırılmıştır.

Doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (r) bulunmuş ve regresyon doğrusu çizilmiştir.

Ayrıca mikroskopik incelemelerden elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler halinde verilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Potasyum Bromat'ın Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Üzerindeki Etkileri

Potasyum bromat insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik muamele süresinde KKD'yi kontrole nazaran genel olarak arttırmış fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunamamıştır (Çizelge 4.1). 48 saatlik muamele süresinde ise Potasyum bromat KKD'yi kontrole nazaran önemli derecede arttırmış olup, bu artış pozitif kontrol kadar olmamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Değişik Dozda Potasyum Bromat ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde Ortalama KKD Sayısı.

Test maddesi	Muamele süresi (saat)	Konsan-trasyon (µg/ml)	Min-Max KKD	KKD/Hücre ±SH
Kontrol	--	●	1-13	4.25±0.69
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25 ○	11-64	39.49±2.26
KBrO ₃	24	400	2-16	7.08±0.94 ^b ₃
		450	1-18	6.74±1.05 ^b ₃
		500 Δ	2-19	7.61±1.34 ^b ₃
		550 ■	2-20	7.59±1.11 ^b ₃
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25 ø	26-94	53.46±8,31
KBrO ₃	48	400 ▢	3-25	11.87±2.06 ^a ₁ ^b ₃
		450 ▲	3-28	12.29±2.30 ^a ₁ ^b ₃
		500 ◇	4-36	16.56±2.72 ^a ₁ ^b ₃
		550 ◼	1-36	12.58±3.25 ^a ₁ ^b ₂

- 1) ● : Toplam 91 hücre incelendi. ○ : Toplam 88 hücre incelendi.
 Δ : Toplam 83 hücre incelendi. ■ : Toplam 83 hücre incelendi.
 ø : Toplam 79 hücre incelendi. ▢ : Toplam 81 hücre incelendi.
 ▲ : Toplam 97 hücre incelendi. ◇ : Toplam 58 hücre incelendi.
 ◼ : Toplam 54 hücre incelendi.

- 2) a : Kontrol ile; b : Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli
 a₁b₁ : P < 0.05 a₂b₂ : P < 0.01 a₃b₃ : P < 0.00

4.2. Potasyum Bromat'ın Kromozomal Anormalliklerin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Potasyum bromat insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliklerini 24 saatlik muamele süresinde tüm dozlarda kontrole göre önemli derecede uyarmıştır (Çizelge 4.2). Çünkü 24 saatlik muamele süresinde AH oranının kontrole nazaran önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). 24 saatlik muamele süresinde tüm dozlarda saptanan AH %'si pozitif kontroldekinden yüksektir, fakat aradaki fark önemli bulunamamıştır (Çizelge 4.2). Yani Potasyum bromat bu muamele süresinde KA'yı pozitif kontrol kadar uyarmıştır. Potasyum bromat'la 24 saat muamele edilen kültürlerde hücre başına düşen anormallik sayısının (KA/Hücre) da kontrolden istatistik olarak önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). Hücre başına düşen kromozom anormalliği sayısının doza bağlı bir artış gösterdiği bulunmuştur (Şekil 4.1).

Potasyum bromat'la 48 saat muamele edilen kültürlerde AH oranının tüm muamele sürelerinde kontrole nazaran önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.2). Bu muamele süresinde sadece en yüksek dozda (550 µg/ml) AH oranının pozitif kontrolden daha yüksek olduğu belirlenmiştir, fakat aradaki fark önemli değildir. Bu muamele süresinde hücre başına düşen anormallik sayısı kontrolden önemli derecede yüksektir (Çizelge 4.2). Ancak en yüksek dozda (550 µg/ml) KA/hücre oranında pozitif kontroldekine nazaran önemli olmayan bir artış görülmüştür. Bu muamele süresinde hücre başına düşen anormallik sayısı doza bağlı olarak önemli derecede artmıştır (Şekil 4.2).

Potasyum bromat insan periferik lenfositlerinde en çok kromatid kırığı (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.15, Şekil 4.16) olmak üzere, kromozom kırığı (Şekil 4.4, Şekil 4.8, Şekil 4.12, Şekil 4.16), kardeş kromatid birleşmesi (Şekil 4.11), kromatid değişimi (Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.16), poliploidi (Şekil 4.6), fragment (Şekil 4.6, Şekil 4.8), endoredublikasyon (Şekil 4.14), disentrik kromozom (Şekil 4.5) gibi anormalliklere sebep olmuştur.

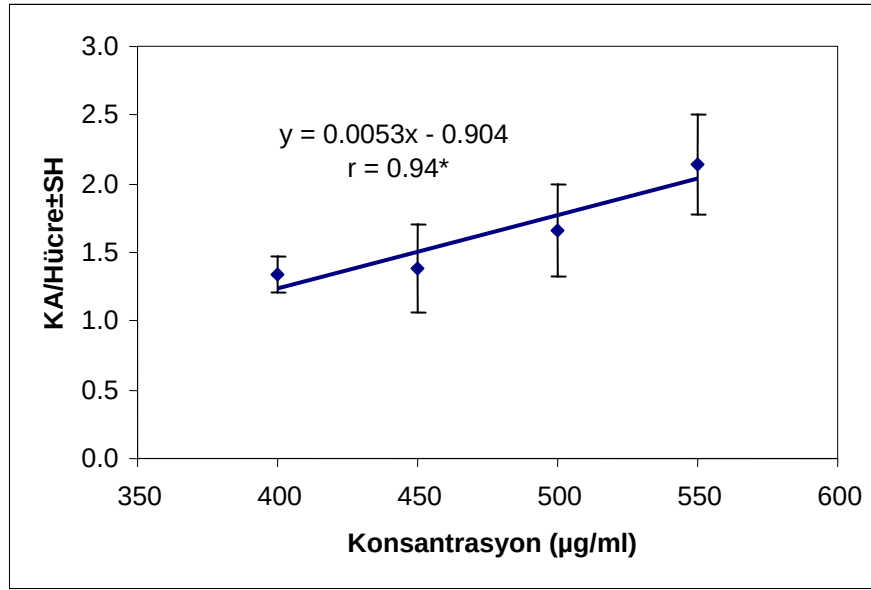
Çizelge 4.2. Değişik Dozda Potasyum Bromat ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde Kromozom Anormallik Çeşitleri, Anormal Hücre Oranı ve KA/Hücre.

Test mad.	Mua. süresi (saat)	Konsan trasyon (µg/ml)	Anormallikler *									Anormal Hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
			B'	B''	F	KKB	DS	T	KD	P	E		
Kontrol	--	--	15	1		4						4.25±1.19	0.05±0.02
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25 ■	131	7	3	8	1		52	46	1	48.34±8.99	0.68±0.12
KBrO ₃	24	400	500	10	5	9	1	5	4	1		60.75±3.43 ^{a2}	1.34±0.13 ^{a2b2}
		450	517	12	9	7	1	3	4	1		56.75±6.45 ^{a1}	1.39±0.32 ^{a1}
		500	625	14	8	3	2	2	11			61.25±7.27 ^{a2}	1.66±0.34 ^{a1}
		550 Δ	624	8	$\frac{1}{7}$	1		2	4			64.5±5.96 ^{a1}	2.14±0.37 ^{a1}
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25 ○	428	7	$\frac{2}{0}$	1	1		181			69.98±8.2	2.76±0.88
KBrO ₃	48	400 ▯	521	5	$\frac{1}{9}$	1	1	2	13	1	2	56.71±1.62 ^{a3}	1.75±0.22 ^{a2}
		450 ▲	628	9	$\frac{2}{1}$	1			17	6	1	61.76±3.09 ^{a2}	1.75±0.15 ^{a2}
		500 ◇	520	5	8			1	17	6	1	56.45±3.4 ^{a2}	2.1±0.34 ^{a2}
		550 ■	449	2	$\frac{1}{5}$	1			15	9		73.16±5.93 ^{a1}	3.15±0.57 ^{a1}

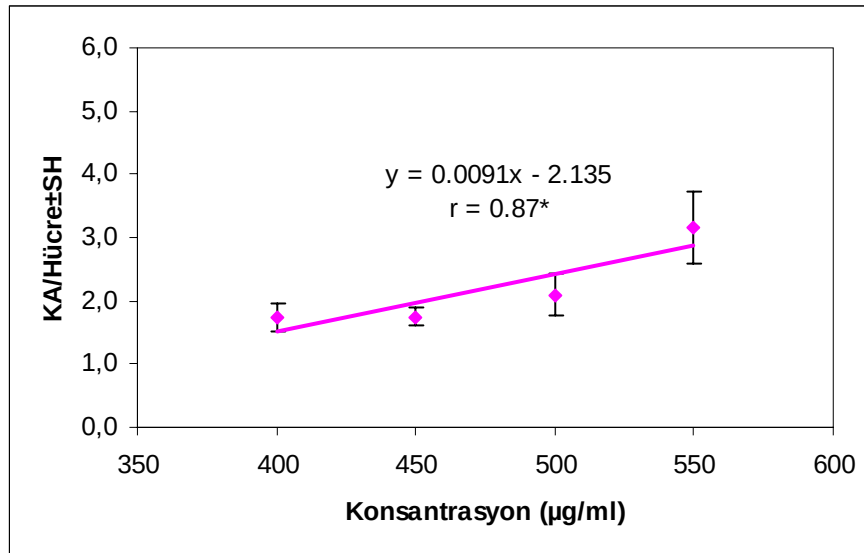
- 1) * B' : Kromatid kırığı; B'' : Kromozom kırığı; F : Fragment; KKB : Kardeş kromatidlerin birleşmesi (Sister Union); DS : Disentrik kromozom; T : Translokasyon; KD : Kromatid Değişimi; P : Poliploidi; E : Endoredublikasyon

- 2) ■ : Toplam 369 hücre incelendi.
 Δ : Toplam 330 hücre incelendi.
 ○ : Toplam 305 hücre incelendi.
 ▯ : Toplam 322 hücre incelendi.
 ▲ : Toplam 389 hücre incelendi.
 ◇ : Toplam 274 hücre incelendi.
 ■ : Toplam 196 hücre incelendi.

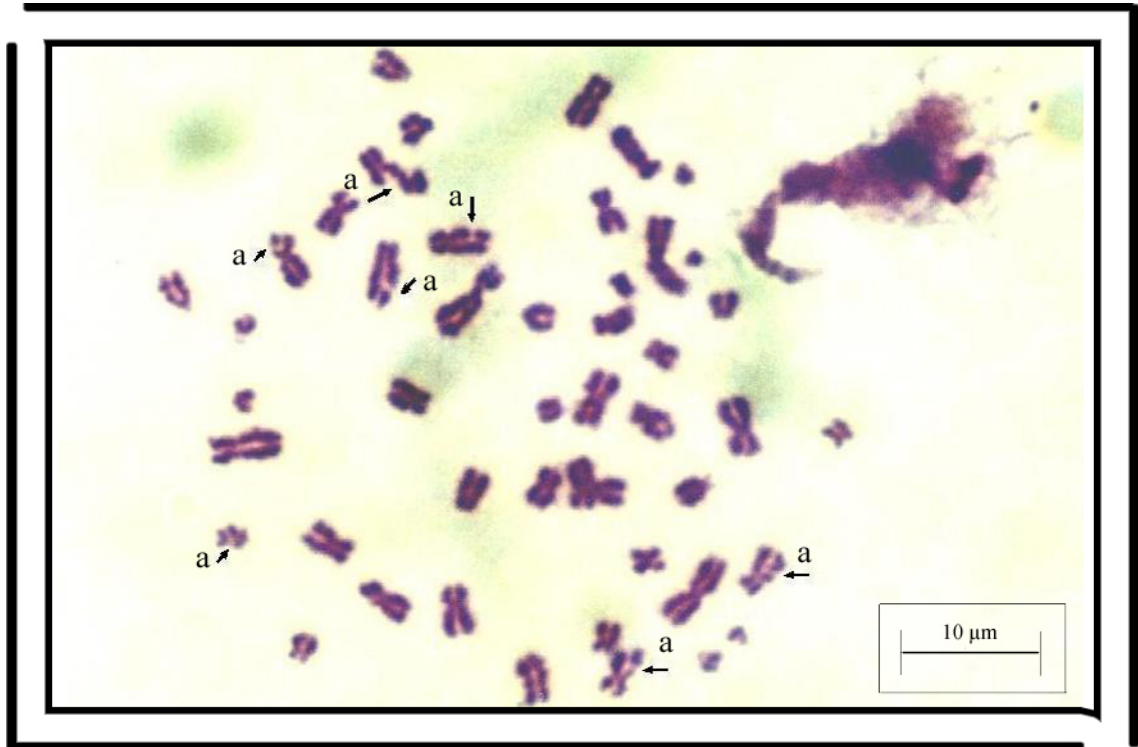
- 3) a : Kontrol ile; b : Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli
 $a_1b_1 : P < 0.05$ $a_2b_2 : P < 0.01$ $a_3b_3 : P < 0.001$



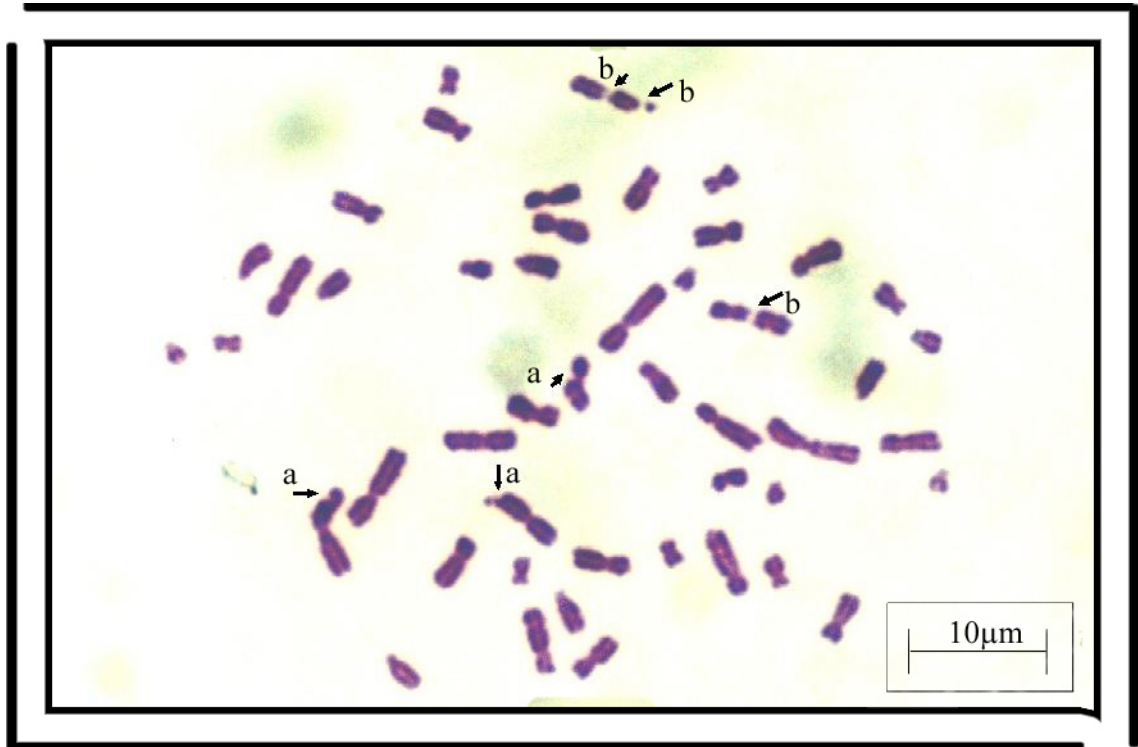
Şekil 4.1. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre'nin Doza Bağlı Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (* : $p \leq 0.05$).



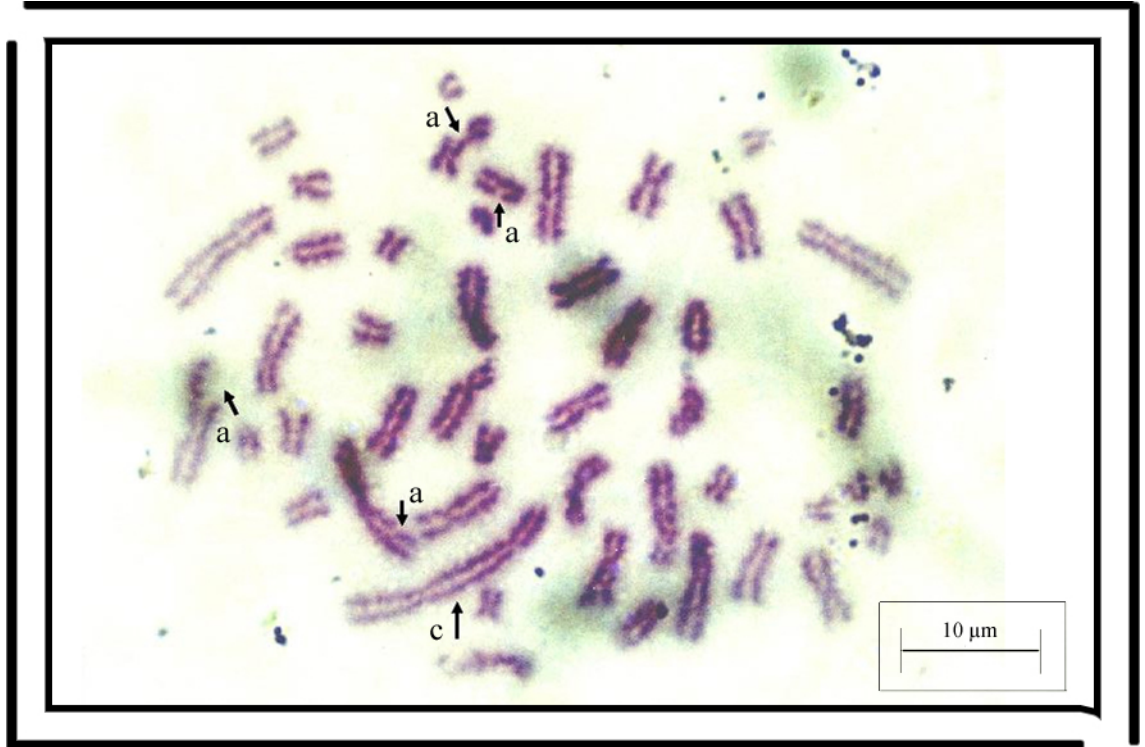
Şekil 4.2. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde KA/Hücre'nin Doza Bağlı Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (* : $p \leq 0.05$).



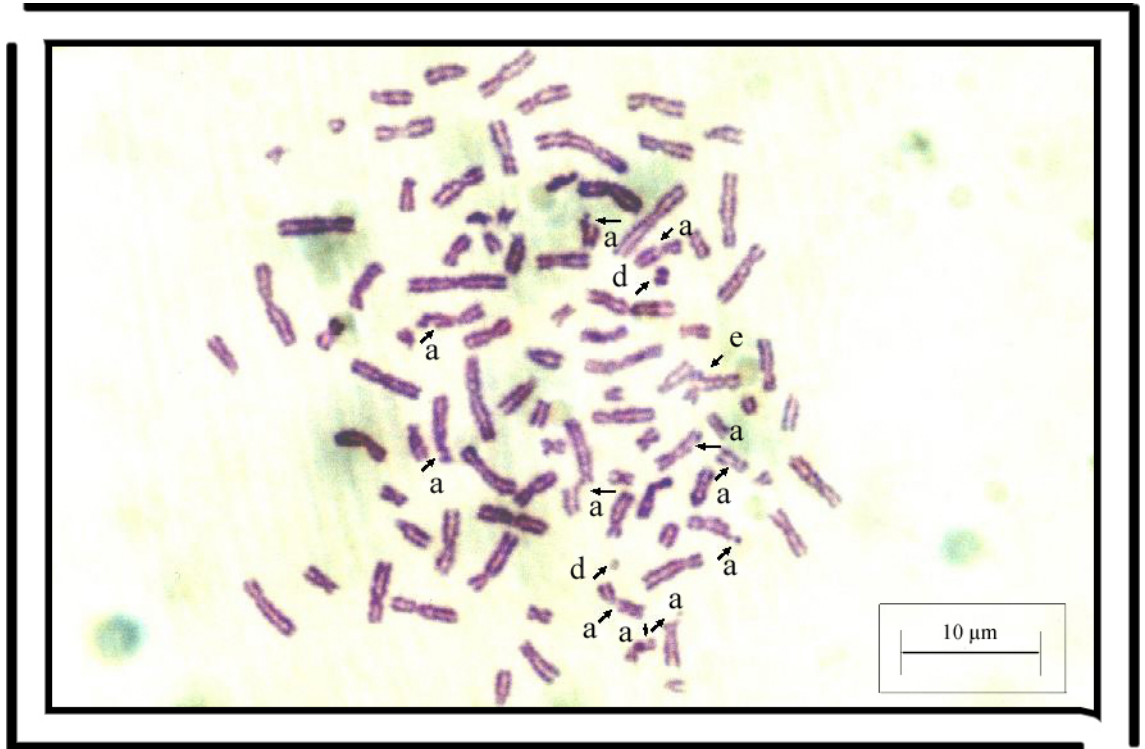
Şekil 4.3. Kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (550 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



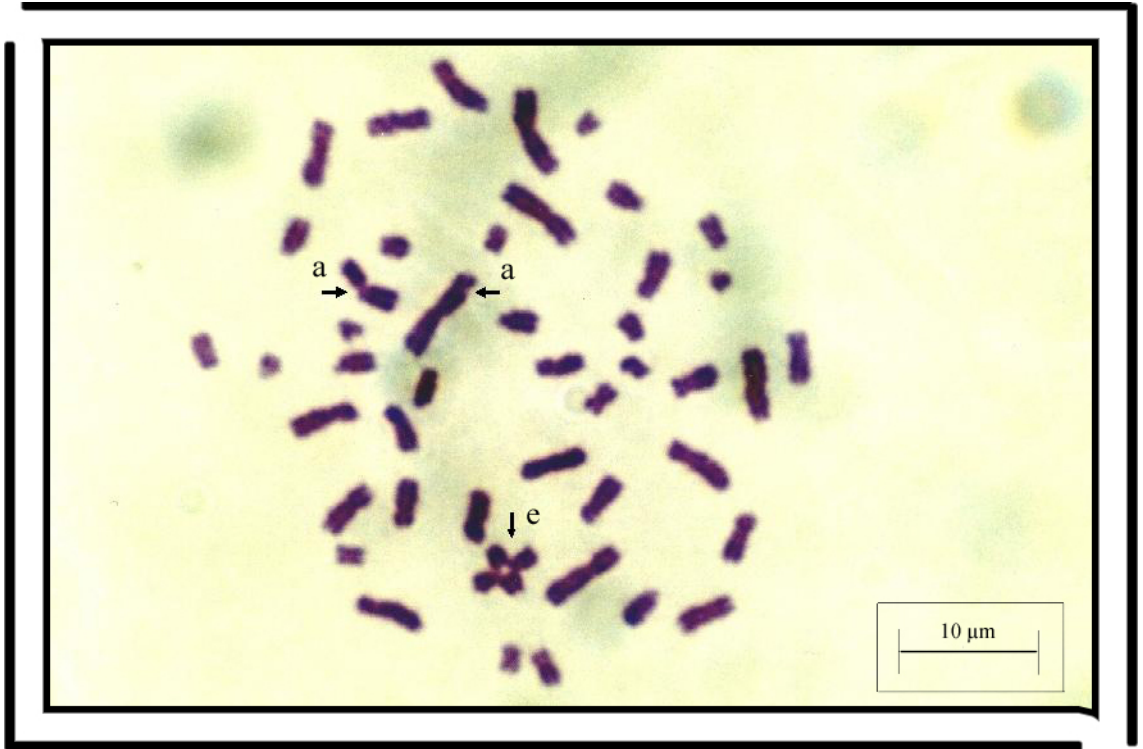
Şekil 4.4. Kromatid kırığı (a) (B') ve kromozom kırığı (b) (B'') bulunan metafaz plağı (550 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



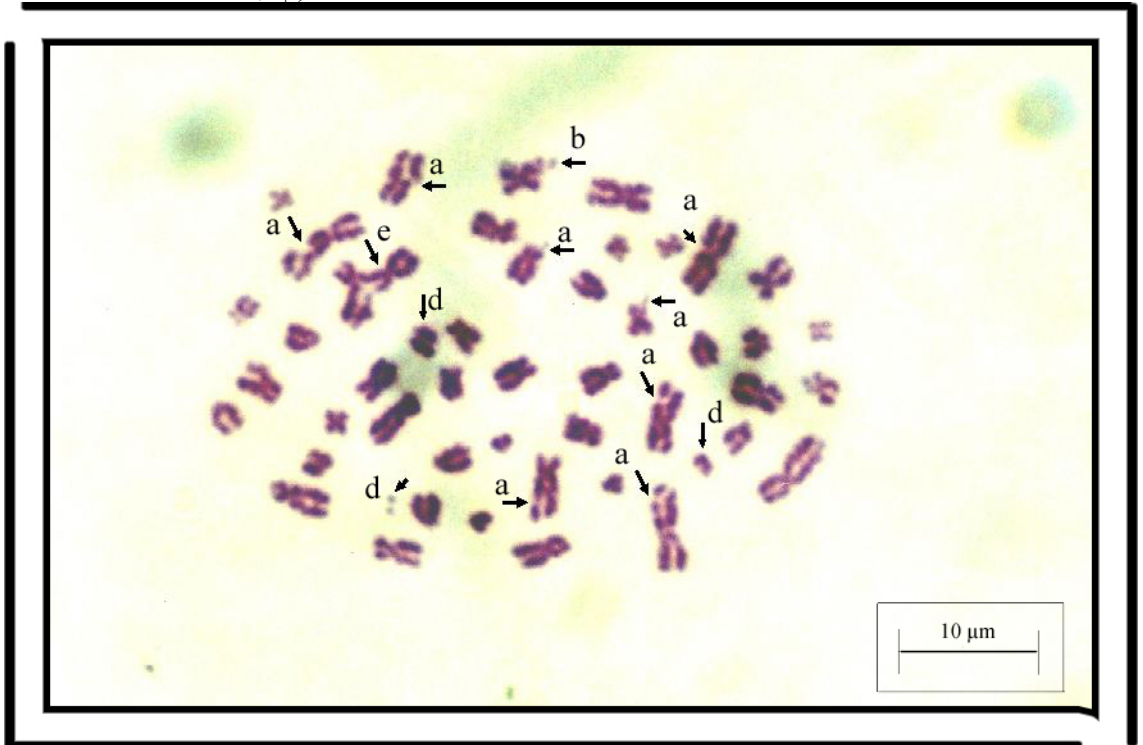
Şekil 4.5. Kromatid kırığı (a) (B') ve disentrik kromozom (c) (DS) bulunan metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♂). X1000



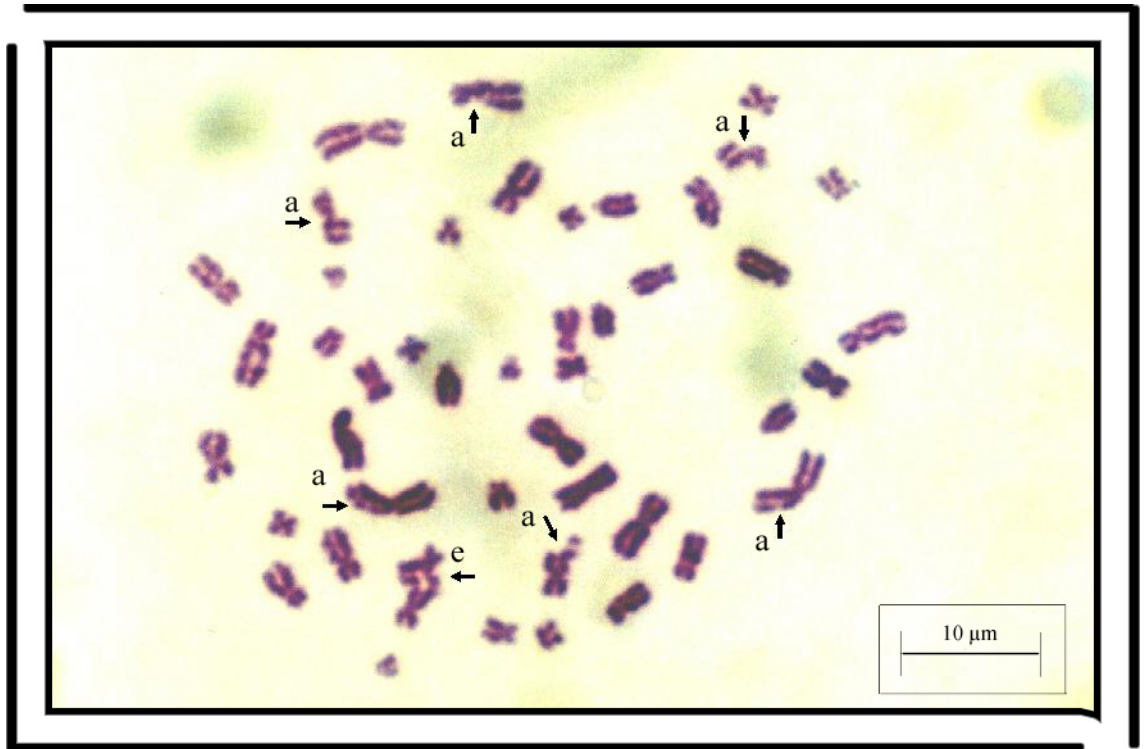
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (a) (B'), fragment (d) (F) ve kromatid değişimi (e) (KD) bulunan poliploidi hücre (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X750



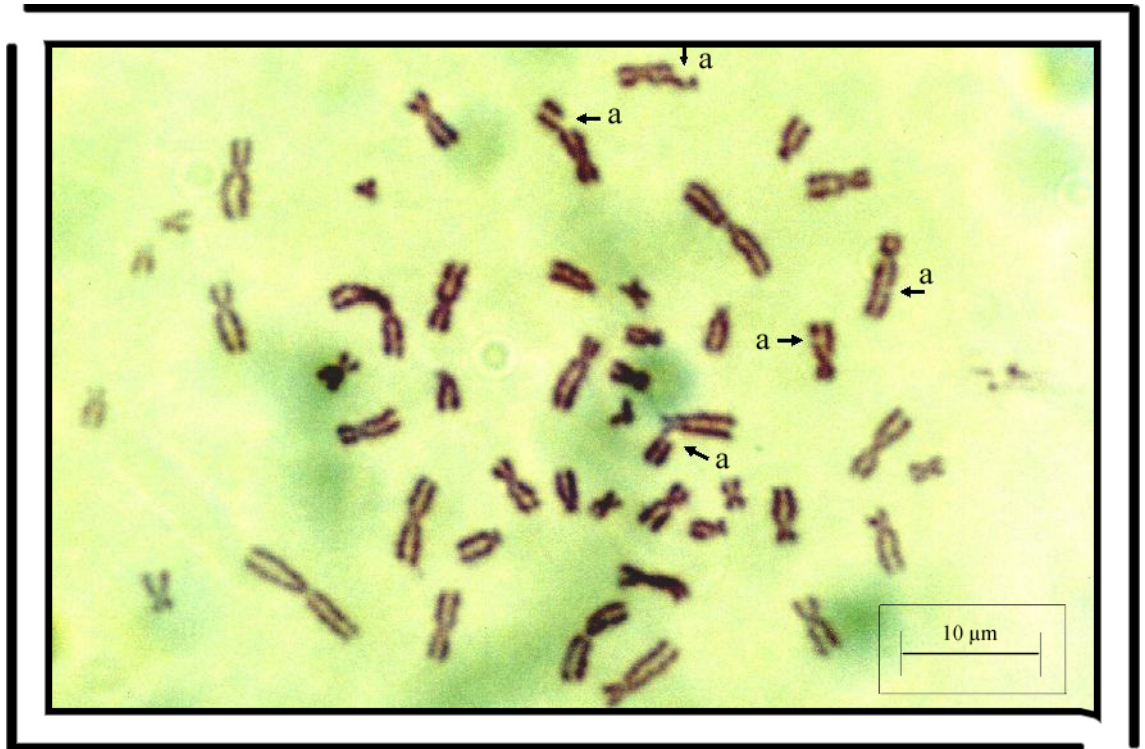
Şekil 4.7. Quadriradial figürlü kromatid değişimi (e) (KD) ve kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (500 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.8. Fragment (d) (F), kromatid kırığı (a) (B'), kromozom kırığı (b) (B'') ve triradial figürlü kromatid değişimi (e) (KD) bulunan metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



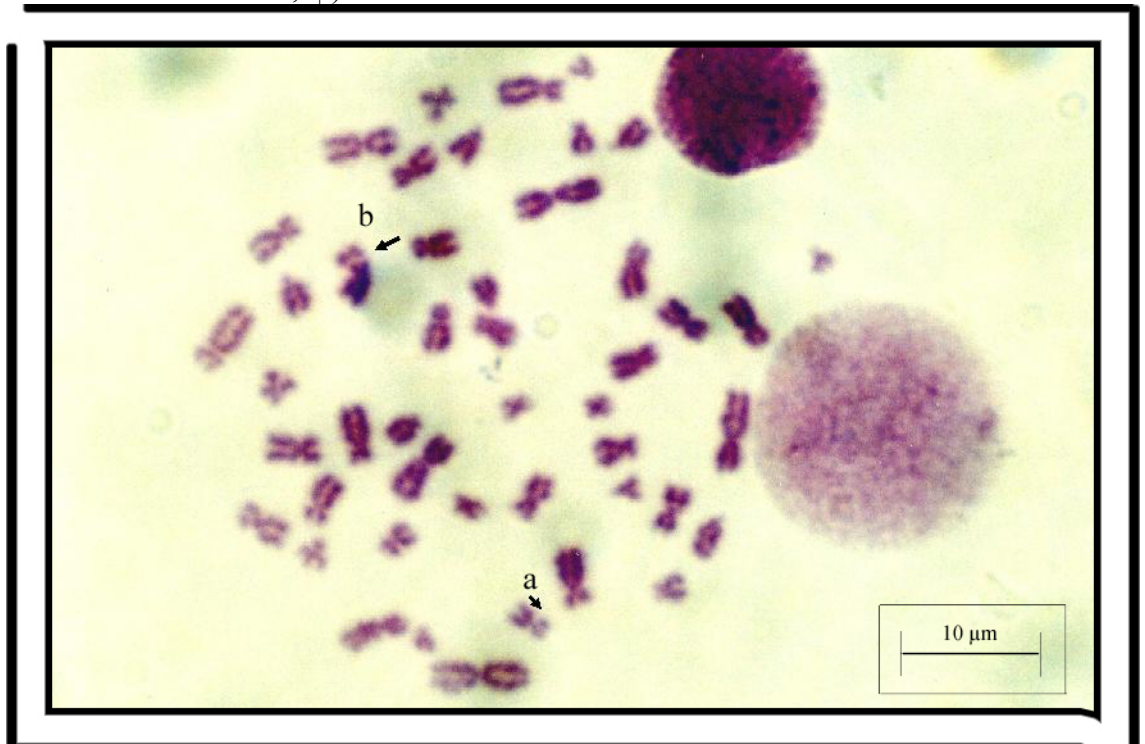
Şekil 4.9. Kromatid değişimi (e) (KD) ve kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



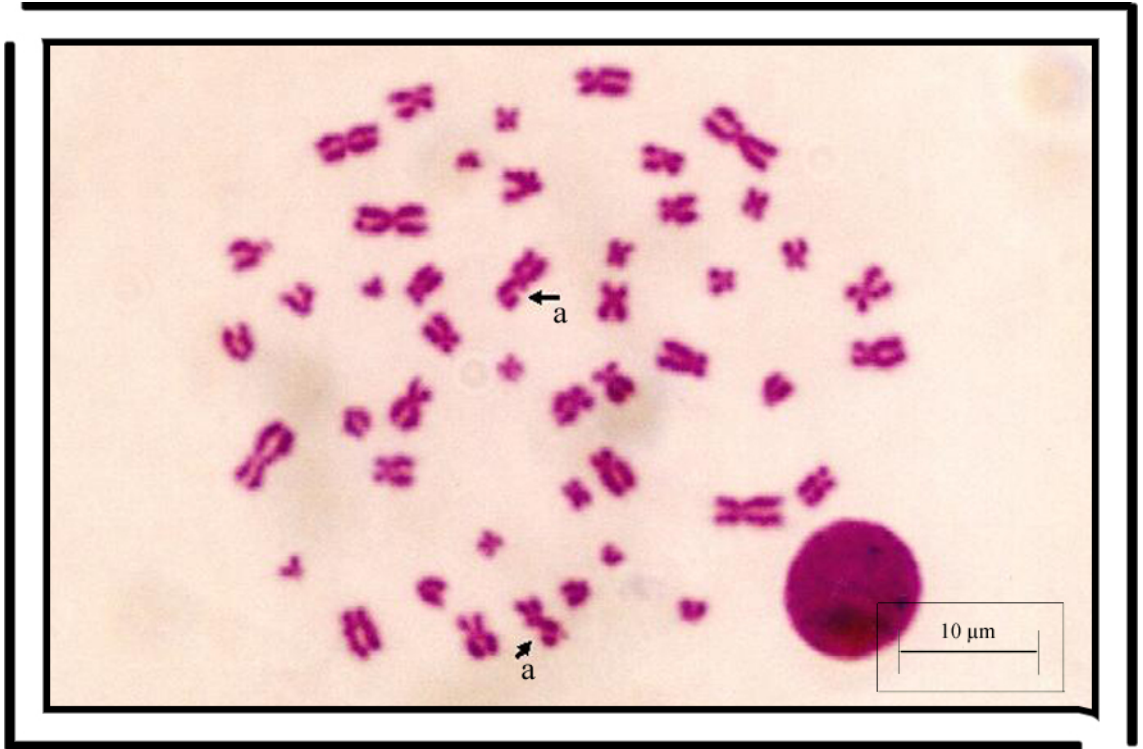
Şekil 4.10. Kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



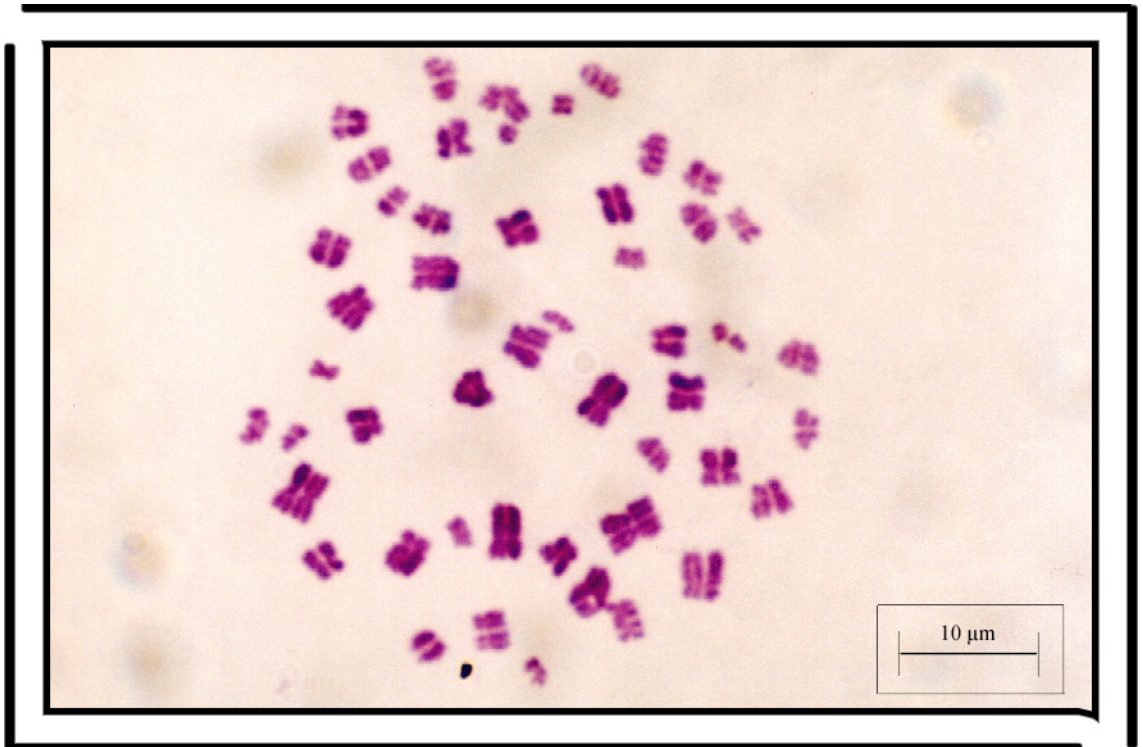
Şekil 4.11. Kardeş kromatid birleşmesi (f) (KKB) ve kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (450 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.12. Kromatid kırığı (a) (B') ve kromozom kırığı (b) (B'') bulunan metafaz plağı (450 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



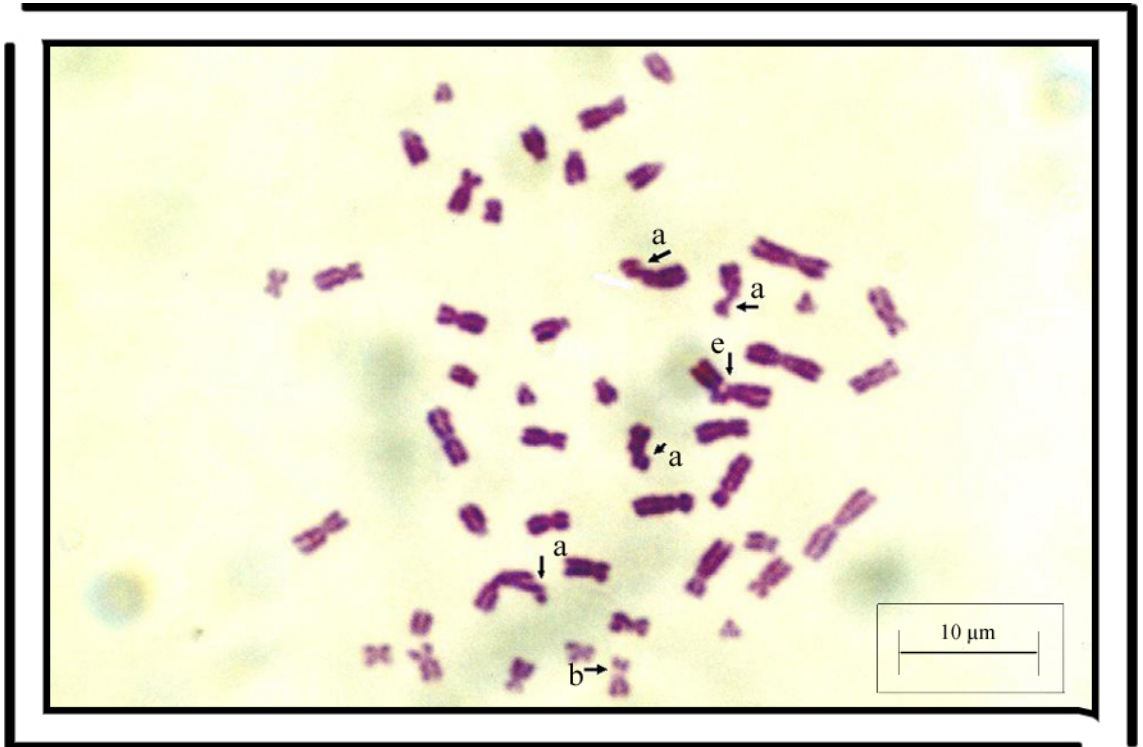
Şekil 4.13. Kromatid kırığı (a) (B') bulunan metafaz plağı (500 µg/ml Potasyum bromat, 24 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.14. Endoredublikasyonlu (E) metafaz plağı (400 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.15. Çok sayıda kromozom anormalliği içeren metafaz plağı (550 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.16. Kromatid kırığı (a) (B'), kromozom kırığı (b) (B'') ve kromatid değişimi (e) (KD) bulunan metafaz plağı (400µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000

4.3. Potasyum Bromat'ın DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

Potasyum Bromat'ın DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin (RI), mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise mitotik indeksin (MI) bulunması yoluyla saptanmıştır.

Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde RI'yi kontrole göre 24 saatlik muamelede önemli derecede düşürmemiştir (Çizelge 4.3). Bu muamele süresinde RI pozitif kontroldekinden önemli derecede yüksek bulunmuştur. 24 saatlik muameleli kültürlerde RI'de doza bağlı düşüş kaydedilmiştir (Şekil 4.17). Potasyum bromat ile 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde RI kontrolden daha düşük bulunmuştur. 48 saat muamele edilen kültürlerde ise RI pozitif kontroldeki kadar düşük bulunmuştur (Çizelge 4.3). Yani Potasyum bromat 48 saatlik muamelede DNA replikasyonunu pozitif kontrol kadar olumsuz yönde etkilemiştir.

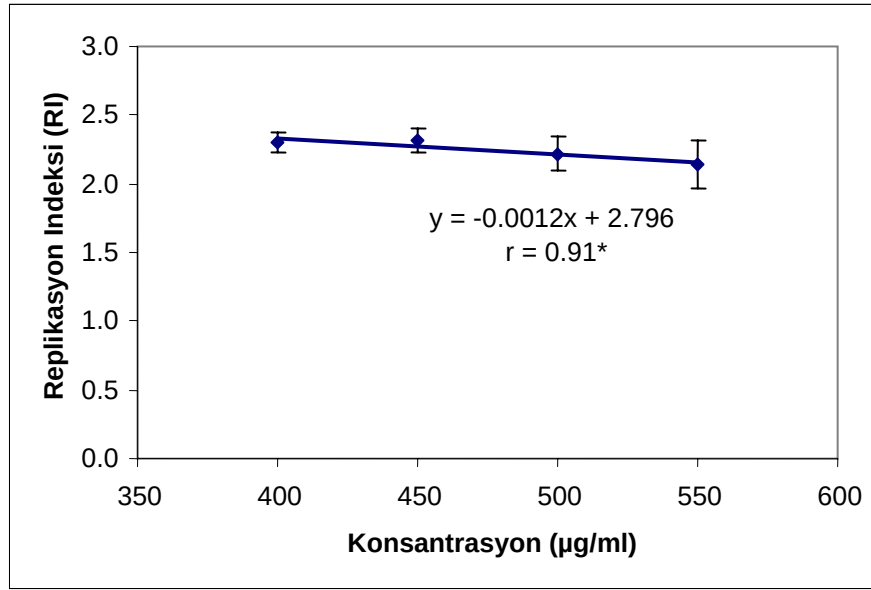
Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde MI'yi kontrole göre 24 saatlik muamelede 450 µg/ml konsantrasyon dışında istatistiksel olarak önemli derecede düşürmüştür. Bu muamele süresinde MI son iki konsantrasyonda da (500 ve 550 µg/ml) pozitif kontrolden düşük bulunmuştur. 48 saatlik muamelede tüm konsantrasyonlarda kontrole nazaran MI'nin düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.3). Bu muamele süresinde Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde mitoz bölünmeyi pozitif kontrole göre 450 µg/ml konsantrasyon dışında istatistiksel olarak önemli derecede olumsuz yönde etkilemiştir (Çizelge 4.3).

Potasyum bromat ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferel lenfositlerinde MI'de doza bağlı olarak düşüş kaydedilmiştir (Şekil 4.18-Şekil 4.19).

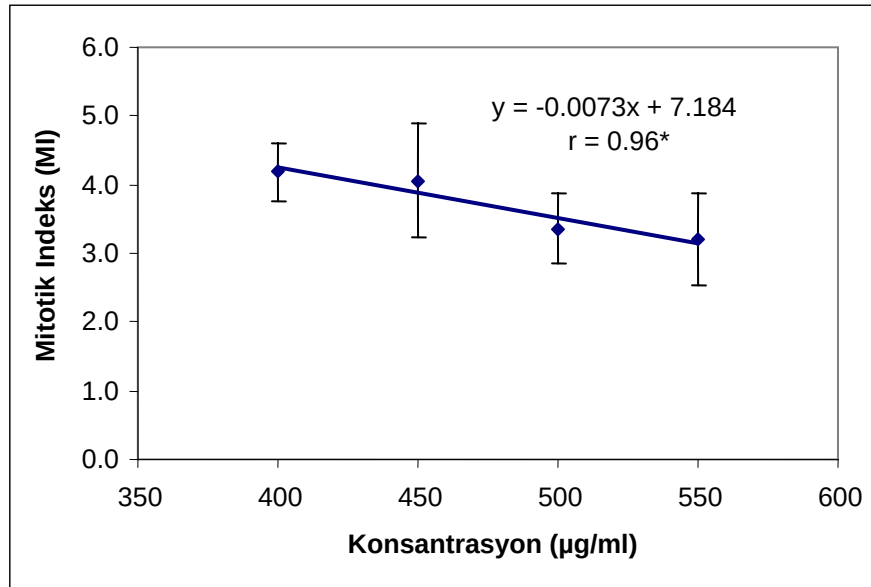
Çizelge 4.3. Değişik Dozda Potasyum Bromat ile 24 ve 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde RI ve MI.

Test maddesi	Muamele süresi (saat)	Konsan-trasyon (µg/ml)	M ₁	M ₂	M ₃	RI±SH	MI±SH
Kontrol	--		65	111	224	2.39±0.05	5.87±0.74
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25	138	127	125	1.35±0.43	5.14±1.64
KBrO ₃	24	400	69	141	190	2.30±0.07 ^{b₃}	4.18±0.43 ^{a₁}
		450	70	132	198	2.32±0.09 ^{b₂}	4.06±0.83
		500	80	123	174	2.22±0.12 ^{b₂}	3.36±0.50 ^{a₁ b₁}
		550	99	114	162	2.14±0.18 ^{b₁}	3.19±0.67 ^{a₁ b₁}
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25	176	103	21	1.48±0.12	3.48±1.65
KBrO ₃	48	400	167	106	90	1.76±0.08 ^{a₂}	2.21±0.38 ^{a₂ b₁}
		450	150	129	121	1.90±0.22	2.41±0.61 ^{a₂}
		500	185	80	117	1.84±0.17 ^{a₁}	1.40±0.28 ^{a₃ b₂}
		550	102	66	72	1.84±0.14 ^{a₁}	1.05±0.26 ^{a₃ b₂}

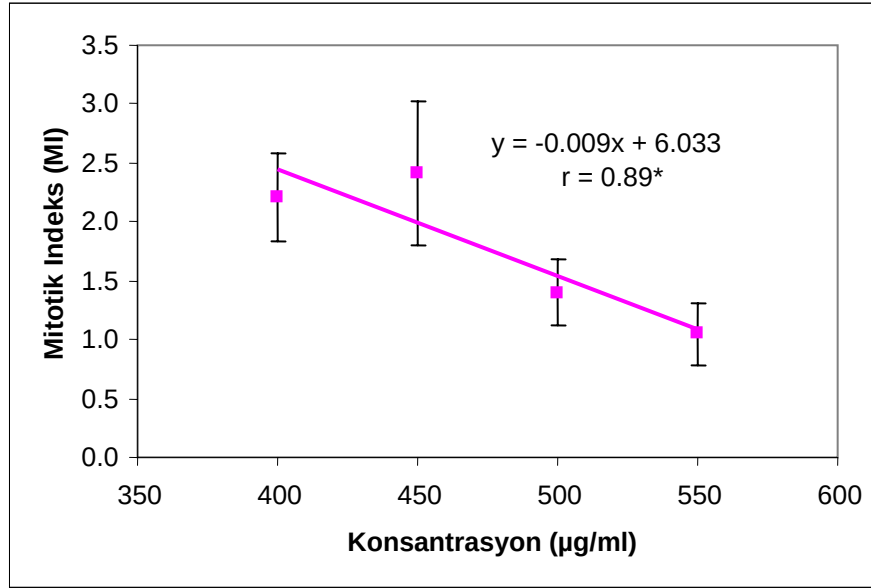
- 1) a : Kontrol ile; b : Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli
a₁b₁ : P < 0.05 a₂b₂ : P < 0.01 a₃b₃ : P < 0.001



Şekil 4.17. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde RI'nin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (* : $p \leq 0.05$).



Şekil 4.18. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MI'nin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (* : $p \leq 0.05$).



Şekil 4.19. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MI'nin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (* : $p \leq 0.05$).

4.4. Potasyum Bromat'ın Mikronukleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

24 saatlik muamele süresinde Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde mikronukleus oluşumunu kontrole göre en düşük dozun dışında genel olarak arttırmış, fakat aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. 48 saatlik muamelede 550 µg/ml konsantrasyon dışında mikronukleus oluşumunu kontrole nazaran Potasyum bromat önemli derecede uyarmıştır (Çizelge 4.4). Bu muamele süresinde Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde mikronukleus oluşumunu pozitif kontrol kadar uyarmamıştır (Çizelge 4.4).

Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde 24 saatlik muamelede mikronukleus oluşumunu doza bağlı olarak uyarmıştır (Şekil 4.20). 48 saatlik muameleli kültürlerde ise mikronukleuslu hücre oranında doza bağlı azalma görülmüştür (Şekil 4.21).

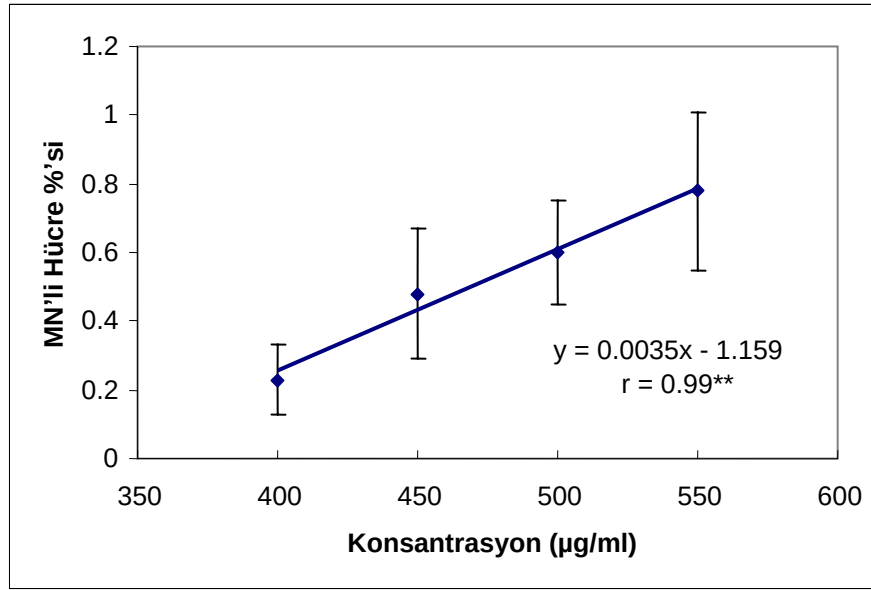
Potasyum bromat insan periferel lenfositlerinde iki nukleuslu hücrelerde farklı sayılarda (Şekil 4.22, Şekil 4.23) ve farklı büyüklüklerde (Şekil 4.24) mikronukleus oluşumlarına sebep olmuştur.

Çizelge 4.4. Değişik Dozda Potasyum Bromat İle Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde Mikronukleus Frekansı

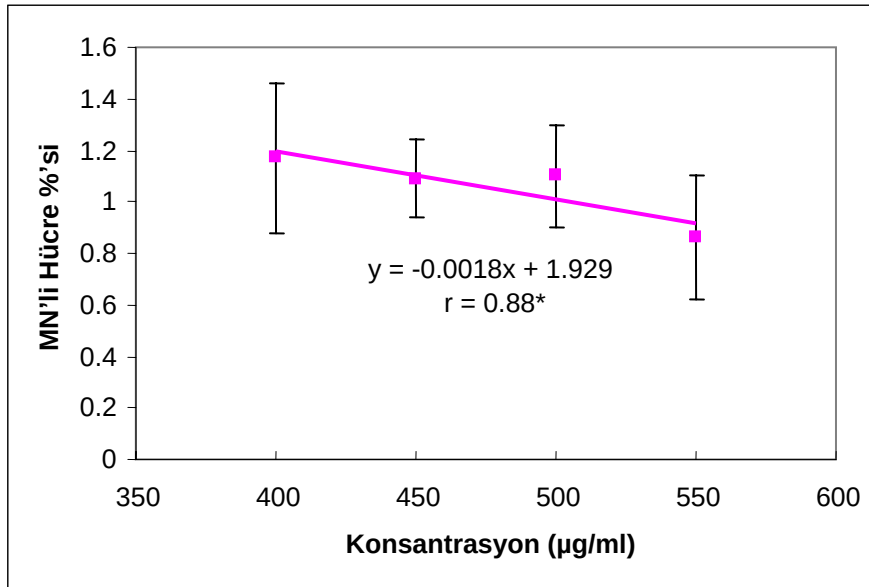
Test Maddesi	Muamele Süresi (saat)	Konsantrasyon (µg/ml)	Mikronukleus içeren iki nükleuslu hücre %'si
Kontrol			0,27±0,06
MMC (pozitif kontrol)	24	0.25	1,27±0,17
KBRO ₃	24	400	0,23±0,10 ^{b₃}
		450	0,48±0,19 ^{b₁}
		500	0,60±0,15 ^{b₁}
		550	0,78±0,23
MMC (pozitif kontrol)	48	0.25	1,97±0,22
KBRO ₃	48	400 Δ	1,17±0,29 ^{a₁ b₁}
		450	1,09±0,15 ^{a₁ b₂}
		500	1,10±0,20 ^{a₁ b₁}
		550 ■	0,86±0,24 ^{b₁}

- 1) Δ :Toplam 9494 iki nükleuslu hücre incelendi.
 ■ :Toplam 8480 iki nükleuslu hücre incelendi.

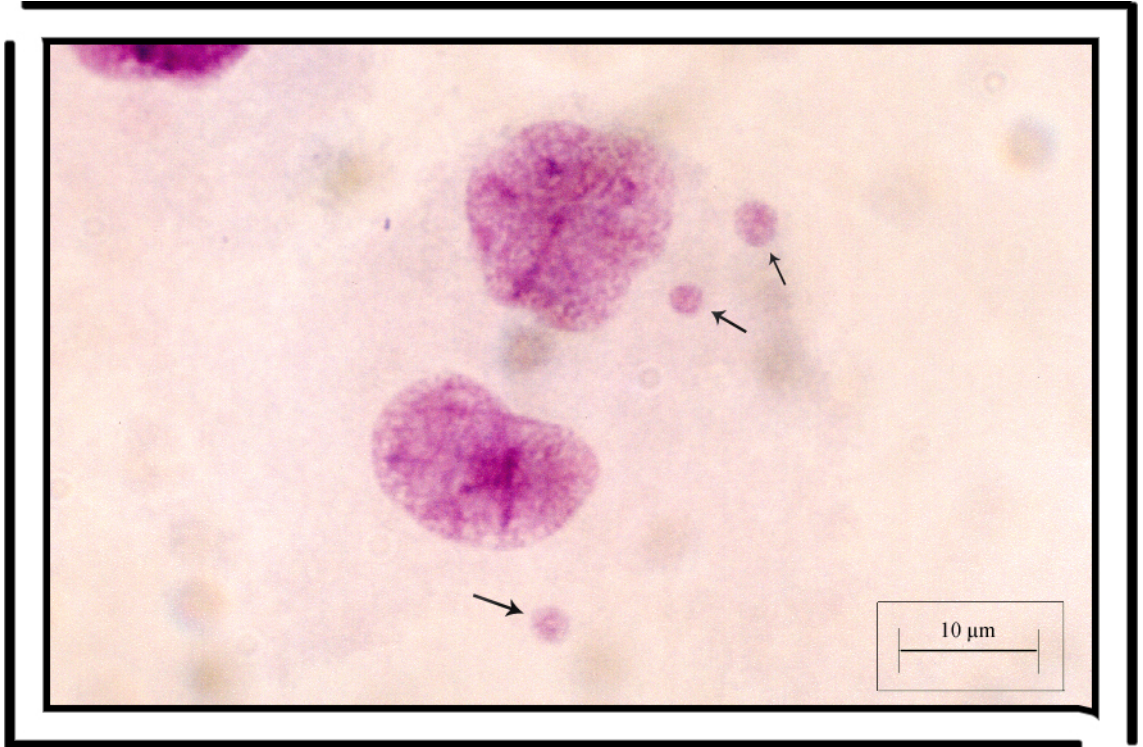
- 2) a : Kontrol ile; b : Pozitif kontrol ile karşılaştırmada fark önemli
 $a_1b_1 : P < 0.05$ $a_2b_2 : P < 0.01$ $a_3b_3 : P < 0.001$



Şekil 4.20. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 24 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MN'li Hücrelerin Yüzdesinin Doza Bağlı Olarak Artışını Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (** : $p \leq 0.01$).



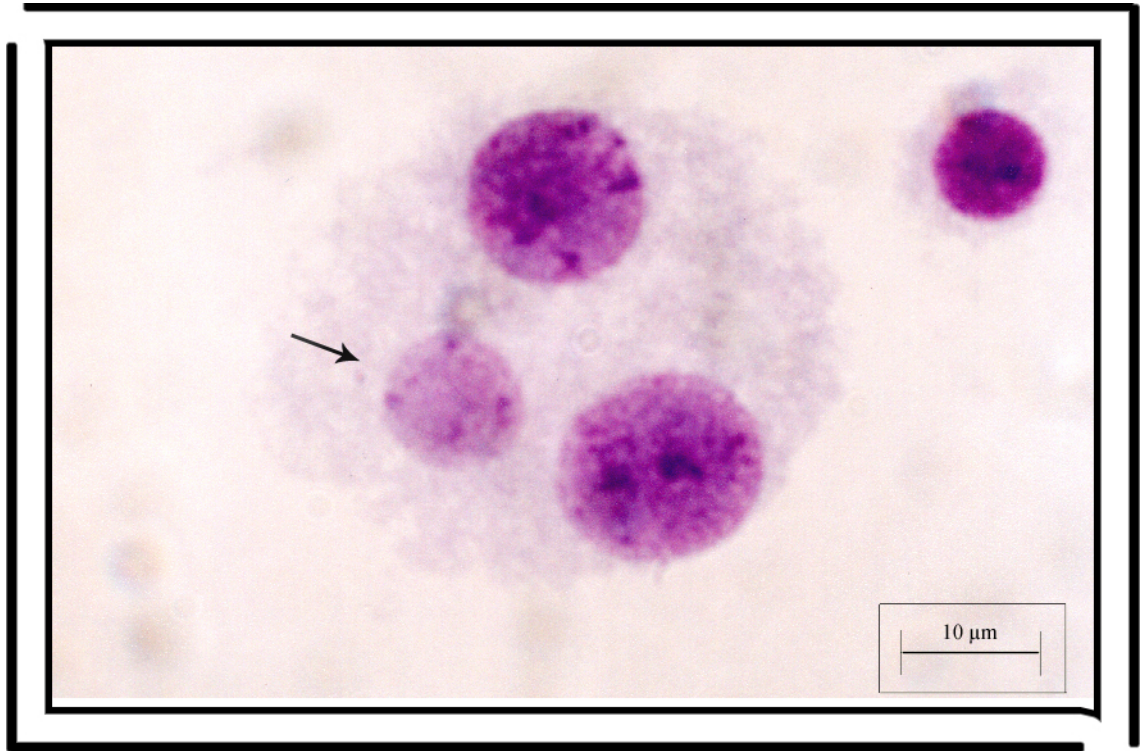
Şekil 4.21. Farklı Dozlarda Potasyum Bromat İle 48 Saat Muamele Edilmiş İnsan Periferik Lenfositlerinde MN'li Hücrelerin Yüzdesinin Doza Bağlı Olarak Düşüşünü Gösteren Regresyon Doğrusu ve Korelasyon Katsayısı (* : $p \leq 0.05$).



Şekil 4.22. 3 mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4.23. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (450 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000



Şekil 4. 24. Mikronukleus içeren iki nukleuslu hücre (500 µg/ml Potasyum bromat, 48 saatlik muamele, ♀). X1000

5.TARTIŞMA

Bu çalışma unda beyazlatıcı madde olarak kullanılan Potasyum bromat'ın 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 genotoksik etkiye sahip olup olmadığını saptamak amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada 400, 450, 500, 550 µg/ml konsantrasyonlardaki Potasyum bromat ile insan periferik lenfositleri *in vitro* olarak 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların sonuçlarıyla tartışılmıştır.

5.1. Potasyum Bromat'ın KKD ve KA'yı Uyarması

KKD testi, mutajenite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan ve en hassas olarak kabul edilen indikatör testlerden biridir (Perry ve Evans 1975; Carrano ve ark. 1978). Bu çalışmada Potasyum Bromat'ın insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik muamele süresinde KKD'yi kontrole nazaran genel olarak arttırdığı fakat bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. 48 saatlik muamele süresinde ise KKD'yi kontrole nazaran önemli derecede artırdığı, bu artışın pozitif kontrol kadar olmadığı saptanmıştır. Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Järventausta ve ark. (1984), Benzoil peroksit'in genotoksik etkisini belirlemek için CHO hücrelerinde, kardeş kromatid değişimi (KKD) testini kullanarak S9mix varlığında KKD'nin uyarıldığını saptamışlardır. Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Swierenga ve ark. (1987), Benzoil peroksit'in V79 hücrelerinde S9mix yokluğunda KKD'nin genotoksik risk açısından önemli olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ile Potasyum bromat gibi bir beyazlatıcı olarak kullanılan Benzoil peroksit'le yapılan bu iki çalışmanın sonuçları uyumaktadır. Bizim ve diğer araştırmacıların sonuçlarına göre Potasyum bromat'ın genotoksik risk taşıma ihtimali vardır.

Yaptığımız çalışmada Potasyum bromat'ın insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliklerini kontrole göre tüm dozlarda, 24 ve 48 saatlik muamele süresinde önemli derecede uyardığı bulunmuştur. Ayrıca Potasyum bromat

kromozom aberasyonunu pozitif kontrol olan MMC kadar uyarmaktadır. Potasyum bromat'la gerek 24 gerekse 48 saat muamele edilen kültürlerde KA'nın doza bağlı olarak arttığı saptanmıştır. Ishidate ve ark. (1984), Potasyum bromat'ın 3 mg/petri dozda *Salmonella*/mikrozom (AMES) testi ve 0.25 mg/ml dozunda Çin hamster fibroblast hücrelerinde kromozom anormaliği testi ile genotoksik olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ile Ishidate ve ark.'nın yaptıkları çalışmanın sonuçları uyushmaktadır. Ancak bu çalışma ile Ishidate ve ark.'nın yaptıkları kromozom anormallikleri testinde farklı dozlarda genotoksik etkinin saptanmış olması çalışılan hücrelerin farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Çünkü biz daha yüksek dozda KA'nın uyarıldığını saptadık. Fujie ve ark. (1988), Potasyum bromat'ın erkek Long-Evans sıçanlarının kemik iliği hücrelerinde 165-501 mg/kg dozlarda doza bağlı olarak intraperitoneal enjeksiyonun 12 saat sonrasında maksimum dereceye ulaşan kromozomal anormallikler tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ile Fujie ve ark.'nın yaptıkları çalışmanın sonuçları uyushmaktadır.

Gerek bu çalışmada gerekse başka araştırmacıların çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre Potasyum bromat KA'yı uyarmaktadır ve bu test ile elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulacak olursa Potasyum bromat'ın genotoksik potansiyele sahip olması kuvvetle muhtemeldir.

Yaptığımız çalışmada Potasyum bromat en çok kromatid ve kromozom kırıklarına sebep olmaktadır. Ballmaier ve Epe (1995), Potasyum bromat'ın kanserojenik etkisinin serbest oksijen radikallerinden dolayı olduğunu, Murata ve ark. (2001) glutatyon (GSH)'un yapısında bulunan SH (sülfür-hidrojen) grubunun serbest oksijen radikallerini yakalayabilme özelliğinden dolayı muhtemelen Potasyum bromat'ın kanserojenik etkisinin azaldığını söylemişlerdir. Kraus ve arkadaşlarının (1995) bildirdiğine göre, Birnboim ve ark. (1983) Potasyum bromat'ın DNA'da iplik kırılmalarına sebep olması nedeniyle tümör oluşumunu uyardığını saptamışlardır. Bu çalışmalardan ortaya çıkan sonuçlara göre DNA ipliğindeki kırılmaların Potasyum bromat'ın oksitlenmesi sırasında meydana gelen serbest oksijen radikallerinden dolayı olabileceğini söylenebilir. DNA'daki iplik kırılmaları sonucunda da kromozom ve kromatid kırıkları oluşmaktadır.

5.2. Potasyum Bromat'ın Mitoz Bölünme ve DNA Replikasyonu Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada Potasyum bromat'ın mitoz bölünme üzerindeki etkisi mitotik indeks (MI), DNA replikasyonu üzerindeki etkisi ise replikasyon indeksinin (RI) (Proliferasyon indeksi=PI) saptanması yoluyla bulunmuştur. Bu çalışmada Potasyum bromat ile 24 saat muamele edilen kültürlerde RI'nin kontrole nazaran düşük olmadığı, 48 saatlik muamele süresinde RI'nin kontrolden düşük olduğu ve bu düşüşün pozitif kontrol kadar olduğu saptanmıştır. Ayrıca 24 saatlik muamelede RI'de doza bağlı düşüş kaydedilmiştir. Bu nedenle Potasyum bromat'ın DNA replikasyonunu olumsuz yönde etkilediği ve bu olayında S fazında gerçekleştiği söylenelebilir.

Potasyum bromat lenfositlerin bölünme aktivitesini hem 24 hem de 48 saatlik muamele sürelerinde olumsuz yönde etkilemiştir. Ayrıca her iki muamele süresinde MI'de doza bağlı düşüş kaydedilmiştir. Umemura ve ark.(1993), Potasyum bromat'ın sıçanların içme suyuna 2 hafta boyunca 500 ve 1750 ppm dozlarda verilmesiyle böbrek hücrelerinin bölünme indeksinde dişi sıçanlar dışında artış saptamışlardır. Bizim yaptığımız çalışma ile Umemura ve ark.'nın yaptığı çalışma birbiriyle uyuşmamaktadır. Bunun sebebinin çalışılan hücre hatlarının ve deney şartlarının farklı olmasından kaynaklandığı söylenilebilir. Dişi sıçanlardaki farkın metabolizmalarının farklı çalışmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Giri ve ark. (1999), Potasyum bromat'ın erkek Wistar sıçanlarına 50, 75 ve 125 mg/kg dozlarda intraperitoneal olarak verilmesiyle kandaki DNA sentezi düzeylerinde doza bağlı artış saptamışlardır. Bizim yaptığımız çalışmanın sonuçları ile Giri ve ark.'nın yaptığı çalışmanın sonuçları birbiriyle uyuşmamaktadır. Bu farkın çalışılan dozların farklı olmasından ve bizim çalışmanın *in vitro* Gri ve ark.'nın çalışmasının *in vivo* olmasından kaynaklandığı söylenilebilir. 24 saatlik muameleli kültürlerde RI pozitif kontrol olan MMC'dekinden daha yüksektir. Halbuki MI bu muamele süresinde pozitif kontrolden özellikle en yüksek iki konsantrasyondakinden düşük bulunmuştur. 48 saatlik muameleli kültürlerde RI pozitif kontroldeki kadardır. MI ise pozitif kontroldekenden daha düşük bulunmuştur. Bu durumlarda Potasyum

bromat'ın hücre bölünmesi üzerindeki olumsuz etkisinin hücre siklusunun S fazı dışındaki bir evredeki etkisinden kaynaklandığını göstermektedir.

5.3. Potasyum Bromat'ın Mikronukleus Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada, 24 saatlik muamele süresinde insan periferik lenfositlerinde Potasyum bromat mikronukleus oluşumunu kontrole nazaran genel olarak artırmış, fakat aradaki fark önemli bulunamamıştır (Çizelge 4.4). Ancak bu muamele süresinde mikronukleus oluşumu doza bağlı olarak artmıştır (Şekil 4.20). 48 saatlik kültürlerde mikronukleuslu hücre %'sinde doza bağlı azalma saptanmıştır. Ancak muameleli kültürlerdeki MN'li hücre oranı kontroldekinden daha yüksektir. Hayashi ve ark (1988), erkek ddY farelerinde Potasyum bromat'ın 0-400 mg/kg dozlarında mikronukleus testiyle genotoksik etkisini araştırmışlar, tek intraperitoneal enjeksiyon sonucunda mikronukleus oluşması saptamışlardır. Awogi ve ark (1992), Potasyum bromat'ı CD-1 erkek farelerine 0-250 mg/kg dozlarında intraperitoneal olarak vermişler, periferik kan retikülositlerinde önemli derecede mikronukleus oluşturduğunu saptamışlardır. Robbiano ve ark (1999), sıçan ve insan böbrek birincil doku kültürü hücrelerinde Potasyum bromat'ın mikronukleus ve DNA hasarı oluşturmasını komet ve mikronukleus testlerini kullanarak araştırmışlar, 0.56-1.8 mM dozlarda istatistiksel olarak kontrollere nazaran önemli derecede DNA hasarı ve mikronukleus oluşması saptamışlardır. Poul ve ark (2004), CHO hücrelerinde Potasyum bromat'ın genotoksik etkilerini komet ve mikronukleus testlerini kullanarak araştırmışlar, 10 mM'da her iki testte DNA hasarı ve mikronukleuslu hücrelerin frekansını arttırdığını saptamışlardır. Yapılan bu 4 çalışma ile bizim çalışmamız birbirleriyle uyumaktadır. Bizim çalışmamızda 24 saatlik muameleli kültürlerde mikronukleus oluşumunu doza bağlı olarak uyarırken 48 saatlik muameleli kültürlerde mikronukleuslu hücre yüzdesinde doza bağlı azalmasının sebebi Potasyum bromat tarafından ilk hücre siklusunda (kültürün başlangıcının 24. ile 48. saatleri arası) kromozomlarda meydana getirilen hasarların hücre ölümüne yol açması olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, Potasyum bromat'ın insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik muamele süresinde KKD'yi kontrole nazaran genel olarak arttırdığı fakat bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Halbuki 48 saatlik muamele süresinde ise Potasyum bromat KKD'yi kontrole nazaran önemli derecede uyarmıştır.

KA, kontrole göre tüm dozlarda ve 24 saatlik muamele süresinde Potasyum bromat tarafından insan periferik lenfositlerinde uyarılmıştır. 24 saatlik muamele süresinde tüm dozlarda saptanan AH %'sinin (kromozom aberasyonlu hücre %'si) pozitif kontroldekinden yüksek olduğu, fakat aradaki farkın önemli olmadığı saptanmıştır. Potasyum bromat'la 24 saat muamele edilen kültürlerde hücre başına düşen anormallik sayısının (KA/hücre) kontrolden istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu ve bu artışında doza bağlı olduğu bulunmuştur. Potasyum bromat'la 48 saat muamele edilen kültürlerde AH oranının tüm muamele sürelerinde kontrole nazaran önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu muamele süresinde hücre başına düşen anormallik sayısı kontrolden önemli derecede yüksektir. 48 saatlik muamele süresinde hücre başına düşen anormallik sayısının doza bağlı olarak önemli derecede arttığı bulunmuştur.

Bu çalışmada, Potasyum bromat'ın 24 ve 48 saatlik muamelelerde hem DNA replikasyonunu hem de mitotik aktiviteyi olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır.

Potasyum bromat insan periferik lenfositlerinde 24 saatlik muamelede mikronukleus oluşumunu doza bağlı olarak uyarmıştır. 48 saatlik muameleli kültürlerde ise mikronukleuslu hücre oranı kontrole nazaran daha yüksektir .

Potasyum bromat'ın genotoksik risk taşıyıp taşımadığıyla ilgili AMES (Ishidate ve ark. 1984, Kargalioğlu ve ark. 2002, Plewa ve ark. 2002), KA (Ishidate ve ark. 1984, Fujie ve ark. 1988), mikronukleus (Hayashi ve ark. 1988, Awogi ve ark. 1992, Sai ve ark. 1992, Robbiano ve ark. 1999, Poul ve ark. 2004), komet (Speit ve ark. 1999, Robbiano ve ark. 1999, Parsons ve ark. 2000, Plewa ve ark. 2002, Poul

ve ark. 2004) testleriyle yapılan çalışmalarda da bu maddenin genotoksik olduğu saptanmıştır.

Aynı zamanda Kurokawa ve ark. (1983), Kurokawa ve ark. (1985), Kurokawa ve ark. (1986), Kurokawa ve ark. (1986a), Kurokawa ve ark. (1987), Umemura ve ark. (1993), Sai ve ark. (1994), Umemura ve ark. (1995), DeAngelo ve ark. (1998), Wolf ve ark. (1998), Umemura ve ark. (2004) yaptıkları çalışmalarda Potasyum bromat'ın kanserojenik olduğunu saptamışlardır.

Gerek bizim, gerekse başka araştırmacıların bu sonuçları göz önünde bulundurulacak olursa Potasyum bromat'ın genotoksik ve kanserojenik riski yüksek bir madde olduğu düşüncesindeyiz. Bu sebeplerden dolayı Potasyum bromat'ın un beyazlatılmasında kullanılmaması gerektiği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- ARAI, T., KELLY, V.P., KOMORO, K., MINOWA, O., NODA, T. and NISHIMURA, S. 2003. Cell proliferation in liver of Mmh/Ogg1-deficient mice enhances mutation frequency because of the presence of 8-hydroxyguanine in DNA. *Cancer Res.*, 63(14): 4287-92.
- ATHAR, M., RAZA, H., BICKERS, D.R. and MUKHTAR, H. 1990. Inhibition of benzoyl peroxide-mediated tumor promotion in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated skin of Sencar mice by antioxidants nordihydroguaiaretic acid and diallyl sulfide. *J. Invest. Dermatol.*, 94(2): 162-5.
- AWOGI, T., MURATA, K., UEJIMA, M., KUWAHARA, T., ASANAMI, S., SHIMONO, K. and MORITA, T. 1992. Induction of micronucleated reticulocytes by potassium bromate and potassium chromate in CD-1 male mice. *Mutat. Res.*, 278(2-3): 181-5.
- BALLMAIER, D. and EPE, B. 1995. Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 16(2): 335-42.
- BOYACIOĞLU, M.H., 1998a. İnsanlık tarihi kadar eski bir gıda: Ekmek. *Gıda.Ocak*, 45-47.
- BOYACIOĞLU, M.H., 1998b. Ekmek Katkı Maddeleri; Tanımları, İşlevleri Ve Bazı Son Çalışmaları. *Gıda.Ekim*, 44-52.
- BOYACIOĞLU, M.H., 2002. Bazı un katkı maddeleri ve bunlara ilişkin ülkemizdeki son gelişmeler. *Gıda.Ekim*, 65-68.
- CADENAS, S. and BARJA, G. 1999. Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic. Biol. Med.*, 26(11-12): 1531-7.
- CARRANO, A.V., THOMPSON, L.H., LINDI, P.A. and MINKLER, J.L., 1978. Sister Chromatid Exchanges As An Indicator Of Mutagenesis. *Nature.*, 271, 551-553.
- CHO, D.H., HONG, J.T., CHIN, K., CHO, T.S. and LEE, B.M. 1993. Organotropic formation and disappearance of 8-hydroxydeoxyguanosine in the kidney of

- Sprague-Dawley rats exposed to adriamycin and KBrO₃. *Cancer Lett.*, 74(3): 141-5.
- COGSWELL, P.C., MAYO, M.W. and BALDWIN, A.S., JR. 1997. Involvement of Egr-1/RelA synergy in distinguishing T cell activation from tumor necrosis factor-alpha-induced NF-kappa B1 transcription. *J. Exp. Med.*, 185(3): 491-7.
- CROSBY, L.M., HYDER, K.S., DEANGELO, A.B., KEPLER, T.B., GASKILL, B., BENAVIDES, G.R., YOON, L. and MORGAN, K.T. 2000. Morphologic analysis correlates with gene expression changes in cultured F344 rat mesothelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 169(3): 205-21.
- DE FLORA, S., CAMOIRANO, A., ZANACCHI, P. and BENNICELLI, C. 1984. Mutagenicity testing with TA97 and TA102 of 30 DNA-damaging compounds, negative with other Salmonella strains. *Mutat. Res.*, 134(2-3): 159-65.
- DEANGELO, A.B., GEORGE, M.H., KILBURN, S.R., MOORE, T.M. and WOLF, D.C. 1998. Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. *Toxicol. Pathol.*, 26(5): 587-94.
- DE VRIESE, A., VANHOLDER, R. and LAMEIRE, N. 1997. Severe acute renal failure due to bromate intoxication: report of a case and discussion of management guidelines based on a review of the literature. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 12(1): 204-9.
- FUJIE, K., SHIMAZU, H., MATSUDA, M. and SUGIYAMA, T. 1988. Acute cytogenetic effects of potassium bromate on rat bone marrow cells *in vivo*. *Mutat. Res.*, 206(4): 455-8.
- GENSLER, H.L. and BOWDEN, G.T. 1983. Evidence suggesting a dissociation of DNA strand scissions and late-stage promotion of tumor cell phenotype. *Carcinogenesis*, 4(12): 1507-11.
- GIRI, U., IQBAL, M. and ATHAR, M. 1999. Potassium bromate (KBrO₃) induces renal proliferative response and damage by elaborating oxidative stress. *Cancer Lett.*, 135(2): 181-8.
- GRIEM, W. 1985. Tumorgene Wirkung von Propionsäure an der Vormagenschleimhaut von Ratten im Fütterungsversuch. *Bundesgesundheitsblatt* 28:322-7.

- HARRINGTON-BROCK, K., COLLARD, D.D. and CHEN, T. 2003. Bromate induces loss of heterozygosity in the thymidine kinase gene of L5178Y/Tk(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutat. Res.*, 537(1): 21-8.
- HARTLEY, J.A., GIBSON, N.W., ZWELLING, L.A. and YUSPA, S.H. 1985. Association of DNA strand breaks with accelerated terminal differentiation in mouse epidermal cells exposed to tumor promoters. *Cancer Res.*, 45(10): 4864-70.
- HAYASHI, M., KISHI, M., SOFUNI, T. and ISHIDATE, M., JR. 1988. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem. Toxicol.*, 26(6): 487-500.
- HERGENHAHN, H.G., ASPAN, A. and SODERHALL, K. 1987. Purification and characterization of a high-Mr proteinase inhibitor of pro-phenol oxidase activation from crayfish plasma. *Biochem. J.*, 248(1): 223-8.
- HUEPER, W.C. 1964. Cancer Induction by Polyurethan and Polysilicone Plastics. *J. Natl. Cancer Inst.*, 33: 1005-27.
- ISHIDATE, M., JR., SOFUNI, T., YOSHIKAWA, K., HAYASHI, M., NOHMI, T., SAWADA, M. and MATSUOKA, A. 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem. Toxicol.*, 22(8): 623-36.
- IVERSEN, O.H. 1986. Carcinogenesis studies with benzoyl peroxide (Panoxyl gel 5%). *J. Invest. Dermatol.*, 86(4): 442-8.
- IVERSEN, O.H. 1988. Skin tumorigenesis and carcinogenesis studies with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, ultraviolet light, benzoyl peroxide (Panoxyl gel 5%) and ointment gel. *Carcinogenesis*, 9(5): 803-9.
- KARGALIOGLU, Y., MCMILLAN, B.J., MINEAR, R.A. and PLEWA, M.J. 2002. Analysis of the cytotoxicity and mutagenicity of drinking water disinfection by-products in *Salmonella typhimurium*. *Teratog.Carcinog.Mutagen.*, 22(2): 113-28.
- KAUDERER, B., ZAMITH, H., PAUMGARTTEN, F.J. and SPEIT, G., 1991. Evaluation of the mutagenicity of beta-myrcene in mammalian cells *in vitro*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 18(1), 28-34.
- KHAN, N. and SULTANA, S. 2004. Abrogation of potassium bromate-induced renal

- oxidative stress and subsequent cell proliferation response by soy isoflavones in Wistar rats. *Toxicology*, 201(1-3): 173-84.
- KITTO, W. And DUMARS, K.W. 1949. Potassium bromate poisoning. *J. Pediatr.*, 35: 197-200.
- KRAUS, A.L., MUNRO, I.C., ORR, J.C., BINDER, R.L., LEBOEUF, R.A. and WILLIAMS, G.M., 1995. Benzoyl Peroxide: An Integrated human Safety Assessment for Carcinogenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 21: 87-107.
- KURATA, Y., DIWAN, B.A. and WARD, J.M. 1992. Lack of renal tumour-initiating activity of a single dose of potassium bromate, a genotoxic renal carcinogen in male F344/NCr rats. *Food Chem. Toxicol.*, 30(3): 251-9.
- KUROKAWA, Y., HAYASHI, Y., MAEKAWA, A., TAKAHASHI, M., KOKUBO, T. and ODASHIMA, S. 1983. Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71(5): 965-72.
- KUROKAWA, Y., TAKAMURA, N., MATSUSHIMA, Y., IMAZAWA, T. and HAYASHI, Y. 1984. Studies on the promoting and complete carcinogenic activities of some oxidizing chemicals in skin carcinogenesis. *Cancer Lett.*, 24(3): 299-304.
- KUROKAWA, Y., AOKI, S., IMAZAWA, T., HAYASHI, Y., MATSUSHIMA, Y. and TAKAMURA, N. 1985. Dose-related enhancing effect of potassium bromate on renal tumorigenesis in rats initiated with N-ethyl-N-hydroxyethyl-nitrosamine. *Jpn. J. Cancer Res.*, 76(7): 583-9.
- KUROKAWA, Y., TAKAYAMA, S., KONISHI, Y., HIASA, Y., ASAHINA, S., TAKAHASHI, M., MAEKAWA, A. and HAYASHI, Y. 1986a. Long-term *in vivo* carcinogenicity tests of potassium bromate, sodium hypochlorite, and sodium chlorite conducted in Japan. *Environ. Health Perspect.*, 69: 221-35.
- KUROKAWA, Y., AOKI, S., MATSUSHIMA, Y., TAKAMURA, N., IMAZAWA, T. and HAYASHI, Y. 1986b. Dose-response studies on the carcinogenicity of potassium bromate in F344 rats after long-term oral administration. *J. Natl. Cancer Inst.*, 77(4): 977-82.

- KUROKAWA, Y., MATSUSHIMA, Y., TAKAMURA, N., IMAZAWA, T. and HAYASHI, Y. 1987. Relationship between the duration of treatment and the incidence of renal cell tumors in male F344 rats administered potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 78(4): 358-64.
- KUROKAWA, Y., MAEKAWA, A., TAKAHASHI, M. and HAYASHI, Y. 1990. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate-a new renal carcinogen. *Environ. Health Perspect.*, 87: 309-35.
- LEE, Y.S., CHOI, J.Y., PARK, M.K., CHOI, E.M., KASAI, H. and CHUNG, M.H. 1996. Induction of oh8Gua glycosylase in rat kidneys by potassium bromate (KBrO₃), a renal oxidative carcinogen. *Mutat. Res.*, 364(3): 227-33.
- MATSUMOTO, I., MORIZONO, T. and PAPARELLA, M.M. 1980. Hearing loss following potassium bromate: two case reports. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 88(5): 625-9.
- MCLAREN, J., BOULIKAS, T. and VAMVAKAS, S. 1994. Induction of poly(ADP-ribosylation) in the kidney after in vivo application of renal carcinogens. *Toxicology*, 88(1-3): 101-12.
- MURATA, M., BANSHO, Y., INOUE, S., ITO, K., OHNISHI, S., MIDORIKAWA, K. and KAWANISHI, S. 2001. Requirement of glutathione and cysteine in guanine-specific oxidation of DNA by carcinogenic potassium bromate. *Chem. Res. Toxicol.*, 14(6): 678-85.
- OPPENHEIMER, B.S., OPPENHEIMER, E.T., DANISHEFSKY, I., STOUT, A.P. and EIRICH, F.R. 1955. Further studies of polymers as carcinogenic agents in animals. *Cancer Res.*, 15(5): 333-40.
- PARSONS, J.L. and CHIPMAN, J.K. 2000. The role of glutathione in DNA damage by potassium bromate in vitro. *Mutagenesis*, 15(4): 311-6.
- PERRY, P. and EVANS, H.J., 1975. Cytological Detection Of Mutagen-Carcinogen Exposure By Sister Chromatid Exchange. *Nature*, 258, 121-125.
- PLEWA, M.J., KARGALIOGLU, Y., VANKERK, D., MINEAR, R.A. and WAGNER, E.D. 2002. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products. *Environ. Mol. Mutagen.*, 40(2): 134-42.

- POIRIER, L.A., MILLER, J.A., MILLER, E.C. and SATO, K. 1967. N-Benzoyloxy-N-methyl-4-aminoazobenzene: its carcinogenic activity in the rat and its reactions with proteins and nucleic acids and their constituents in vitro. *Cancer Res.*, 27(9): 1600-13.
- POUL, J.M., HUET, S., GODARD, T. and SANDERS, P. 2004. Lack of genotoxicity of potassium iodate in the alkaline comet assay and in the cytokinesis-block micronucleus test. Comparison to potassium bromate. *Food Chem. Toxicol.*, 42(2): 203-9.
- QUICK, C.A., CHOLE, R.A. and MAUER, M. 1975. Deafness and renal failure due to potassium bromate poisoning. *Arch. Otolaryngol.*, 101(8): 494-5.
- RENCÜZOĞULLARI, E., and TOPAKTAŞ, M., 1991. The Relationship between Quantities of Bromodeoxyuridine and human Peripheral blood with Determination of the Best differential staining of Sister Chromatids Using Chromosome Medium-B. *Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5(3), 19-24.
- ROBBIANO, L., CARROZZINO, R., PUGLIA, C.P., CORBU, C. and BRAMBILLA, G. 1999. Correlation between induction of DNA fragmentation and micronuclei formation in kidney cells from rats and humans and tissue-specific carcinogenic activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 161(2): 153-9.
- ROTHFUSS, A., SCHUTZ, P., BOCHUM, S., VOLM, T., EBERHARDT, E., KREIENBERG, R., VOGEL, W. and SPEIT, G. 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. *Cancer Res.*, 60(2): 390-4.
- SAFFIOTTI, U., SHUBIK, P. and OPDYKE, D.L. 1962. Carcinogenesis tests on alkylbenzenes and alkylbenzene sulfonates. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 4: 763-9.
- SAI, K., TAKAGI, A., UMEMURA, T., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y. 1991. Relation of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in rat kidney to lipid peroxidation, glutathione level and relative organ weight after a single administration of potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 82(2): 165-9.
- SAI, K., HAYASHI, M., TAKAGI, A., HASEGAWA, R., SOFUNI, T. and KUROKAWA, Y. 1992a. Effects of antioxidants on induction of micronuclei in

- rat peripheral blood reticulocytes by potassium bromate. *Mutat. Res.*, 269(1): 113-8.
- SAI, K., UMEMURA, T., TAKAGI, A., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y. 1992b. The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83(1): 45-51.
- SAI, K., TYSON, C.A., THOMAS, D.W., DABBS, J.E., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y. 1994. Oxidative DNA damage induced by potassium bromate in isolated rat renal proximal tubules and renal nuclei. *Cancer Lett.*, 87(1): 1-7.
- SALADINO, A.J., WILLEY, J.C., LECHNER, J.F., GRAFSTROM, R.C., LAVECK, M. and HARRIS, C.C. 1985. Effects of formaldehyde, acetaldehyde, benzoyl peroxide, and hydrogen peroxide on cultured normal human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.*, 45(6): 2522-6.
- SCHWEIZER, J., LOEHRKE, H., EDLER, L. and GOERTTLER, K. 1987. Benzoyl peroxide promotes the formation of melanotic tumors in the skin of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated Syrian golden hamsters. *Carcinogenesis*, 8(3): 479-82.
- SHARRATT, M., FRAZER, A.C. and FORBES, O.C. 1964. Study of the Biological Effects of Benzoyl Peroxide. *Food Cosmet. Toxicol.*, 19: 527-38.
- SHIAO, Y.H., KAMATA, S.I., LI, L.M., HOOTH, M.J., DEANGELO, A.B., ANDERSON, L.M. and WOLF, D.C. 2002. Mutations in the VHL gene from potassium bromate-induced rat clear cell renal tumors. *Cancer Lett.*, 187(1-2): 207-14.
- SLAGA, T.J., KLEIN-SZANTO, A.J., TRIPLETT, L.L., YOTTI, L.P. and TROSKO, K.E. 1981. Skin tumor-promoting activity of benzoyl peroxide, a widely used free radical-generating compound. *Science*, 213(4511): 1023-5.
- SPEIT, G. 1984. Considerations on the mechanism of differential Giemsa staining of BrdU-substituted chromosomes. *Hum. Genet.*, 67(3): 264-9.
- SPEIT, G., and 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. Gen.*, 70, 126-129.
- SPEIT, G., HAUPTER, S., SCHUTZ, P. and KREIS, P. 1999. Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutat. Res.*, 439(2): 213-21.
- STEWART, T.H., SHERMAN, Y. and POLITZER, W.M. 1969. An outbreak of food-poisoning due to a flour improver, potassium bromate. *S. Afr. Med. J.*, 43(8): 200-2.
- SUGIHARA, A., SAIKI, S., TSUJI, M., TSUJIMURA, T., NAKATA, Y., KUBOTA, A., KOTAKE, T. and TERADA, N. 1997. Expression of Fas and Fas ligand in the testes and testicular germ cell tumors: an immunohistochemical study. *Anticancer Res.*, 17(5B): 3861-5.
- TOPAKTAS, M., and SPEIT G., 1990. Sister Chromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde kullanılması. *Ç.Ü. Sağlık Bil. Der.*, 5(1,2,3), 73-84.
- TOPAKTAS, M., RENCUZOGULLARI, E. 1995. *Sitogenetik*, Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, 182s.
- UMEMURA, T., SAI, K., TAKAGI, A., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y. 1993. A possible role for cell proliferation in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 119(8): 463-9.
- UMEMURA, T., SAI, K., TAKAGI, A., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y. 1995. A possible role for oxidative stress in potassium bromate (KBrO₃) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 16(3): 593-7.
- UMEMURA, T., TAKAGI, A., SAI, K., HASEGAWA, R. and KUROKAWA, Y. 1998. Oxidative DNA damage and cell proliferation in kidneys of male and female rats during 13-weeks exposure to potassium bromate (KBrO₃). *Arch. Toxicol.*, 72(5): 264-9.
- UMEMURA, T., KITAMURA, Y., KANKI, K., MARUYAMA, S., OKAZAKI, K., IMAZAWA, T., NISHIMURA, T., HASEGAWA, R., NISHIKAWA, A. and HIROSE, M. 2004. Dose-related changes of oxidative stress and cell

proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate. *Cancer Sci.*, 95(5): 393-8.

VAN DUUREN, B.L., NELSON, N., ORRIS, L., PALMES, E.D. and SCHMITT, F.L. 1963. Carcinogenicity of Epoxides, Lactones, and Peroxy Compounds. *J. Natl. Cancer Inst.*, 31: 41-55.

WOLF, D.C., CROSBY, L.M., GEORGE, M.H., KILBURN, S.R., MOORE, T.M., MILLER, R.T. and DEANGELO, A.B. 1998. Time- and dose-dependent development of potassium bromate-induced tumors in male Fischer 344 rats. *Toxicol Pathol.*, 26(6): 724-9.

<http://www.asbe.org/bromate/background.html> 11.05.2005 11:41

<http://www.chemicaland21.com/arokorhi/industrialchem/inorganic/POTASSIUM%20BROMATE.htm> 18.05.2005 20:25

<http://www.ekmekdunyasi.com/ekmekhastaliklari.htm> 14.06.2005 09:58

<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/p5576.htm> 07.05.2005 15:32

<http://www.keymix.com/bromate.htm> 02.06.2005 14:30

http://ptcl.chem.ox.ac.uk/MSDS/PO/potassium_bromate.html 25.05.2005 19:52

<http://www.archive.official-documents.co.uk/document/doh/toxicity/toxic.htm>
02.04.2005 19:58

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Adana’da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana’da, lise öğrenimimi Kahramanmaraş’ta tamamladıktan sonra 1998 yılında Ç.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde öğrenime başladım ve 2002 yılında mezun oldum. Aynı yıl Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında başladığım Yüksek Lisans öğrenimime devam etmekteyim.