

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜKÜRT DİOKSİT'İN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nihal ÜREN
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL

MALATYA – 2011

T.C
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KÜKÜRT DİOKSİT'İN GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nihal ÜREN

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL


MALATYA – 2011

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI  İmza

Üye Prof. Dr. Elif YEŞİLADA 

Danışman Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL 

ONAY :

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu...../...../2011 tarih ve 2011/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince yardımlarıyla bana destek olan tez danışmanı hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Şengül YÜKSEL' e teşekkür ederim.

Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Elif YEŞİLADA'ya, Anabilim Dalımızın diğer değerli hocaları; Sayın Doç. Dr. Başak KAYHAN'a, Sayın Doç. Dr. Yılmaz Çiğremiş'e ve Sayın Dr. Serap SAVACI'ya eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Deneylerin yapılması sırasında gerekli ortamın sağlanmasında bilimsel, akademik yönlendirmelerinden dolayı tüm bu süreçte desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Yunus ÖNAL'a ve Sayın Kimyager Gülşah KARADÖL'e teşekkür ederim.

Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Saim YOLOĞLU' na teşekkür ederim.

Nihal ÜREN

ÖZET

Kayısı başta olmak üzere işlenmiş gıdaların pek çoğunda koruyucu madde olarak kullanılan kükürt dioksit (SO_2), toksisitesi bilinen genel bir hava kirleticisidir. Malatya ve yöresinde kayısı tarımı ve işletmesi ile uğraşan insanlar SO_2 gazına maruz kalmaktadır. SO_2 maruziyetinin solunum yolları hastalıklarına, kansere hatta yüksek dozda ölüme neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, SO_2 'nin olası genotoksik etkileri, insan lenfosit kromozomlarında, kromozom aberasyonları (KA), kardeş kromatid değişimleri (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılarak araştırıldı. SO_2 0.05, 0.50 ve 1.00 ppm olmak üzere üç farklı dozda uygulandı. SO_2 uygulanan tüm konsantrasyonlarda KA oluşumunu tetikledi. Aynı şekilde uygulanan maksimum ve orta dozlarda KKD ve MN frekanslarında anlamlı bir artış gözlemlendi. SO_2 tüm uygulama gruplarında hücre büyüme ve proliferasyon kinetiklerinden mitotik indeksi (MI) ve replikasyon indeksini (RI) azalttı. Sonuç olarak SO_2 *in vitro* şartlarda uygulanan dozlarda mutajenik etki göstererek malignansiye yol açabilecek hasarlara neden oldu.

Anahtar Kelimeler: Kükürt dioksit, kardeş kromatid değişimi, kromozom aberasyonları, mikronükleus, genotoksisite

ABSTRACT**THE INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF SULFUR DIOXIDE**

Sulfur dioxide (SO₂) which used as food preservative in apricot sulfurization and several fabricated foods is a common air pollutant. Workers involved in apricot sulfurization inhale SO₂ gas during the sulfurization processes. It is known that exposure to SO₂ gas cause diseases of pulmonary, cancer and also mortality at high dosage. In this study, possible genotoxic effects of SO₂ were evaluated on human lymphocyte chromosomes using chromosome aberrations (CA), sister chromatide exchanges (SCE), micronucleus (MN) and cell growth kinetics as parameters. SO₂ treated three different concentrations as 0.05, 0.50 and 1.00 ppm dosage. SO₂ induced CA at all concentrations. Similary there was a significant increase in the frequency of SCE and MN in middle and high dosage groups as compared to control group. SO₂ decreased mitotic index and replication index at all concentrations. In condution, SO₂ has potent mutagenity and it can cause genetic damage leading to a malignancy.

Key Words: Sulfur dioxide, sister chromatide exchanges, chromosome aberrations, micronucleus, genotoxicity

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kükürt'ün Tarihçesi	3
2.2. Kükürt'ün Kimyasal Özellikleri.....	3
2.3. Kükürt Dioksit (SO ₂) Gazı	6
2.3.1. Kükürt ve Kükürt dioksit'in Kullanım Alanları.....	6
2.3.2. Kükürt Dioksit'in Toksik Etkileri	8
2.4. Malatya'da Kükürt dioksit Kullanımı	15
2.5. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD).....	17
2.5.1. Kardeş Kromatid Değişimi Analiz Yöntemleri.....	18
2.5.2. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemini Etkileyen Faktörler	20
2.6. Replikasyon İndeksi (RI)	22
2.7. Kromozom Aberasyonları (KA)	24
2.8. Mitotik İndeks (MI)	26
2.9. Mikronükleus (MN)	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları	29
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.1.1.1. Kükürt Dioksit.....	29
3.1.1.2. Siklofosfamid (Cyclophosphamide)	29
3.1.1.3. Kromozom Medyumu	29
3.1.1.4. Kolşisin.....	30

3.1.1.5. Hipotonik	30
3.1.1.6. Fiksatif	30
3.1.1.7. 5'-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU).....	30
3.1.1.8. Sorenson Tamponu	30
3.1.1.9. SSC (Standart Saline Sitrat) Eriyiği	31
3.1.1.10. PBS (Phosphate Buffered Saline)	31
3.1.1.11. Giemsa.....	31
3.1.1.12. Entellan	31
3.1.1.13. Cytochiasin B	32
3.1.1.14. Tripsin	32
3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları.....	32
3.1.2.1. Analytik Jena Multi EA UV Dedektörü Kükürt Tayin Cihazı.....	32
3.1.2.2. Hassas Terazi	32
3.1.2.3. Santrifüj.....	32
3.1.2.4. Mikroskop	32
3.1.2.5. İnkübatör	32
3.1.2.6. Flow Kabin (Steril Kabin)	33
3.1.2.7. Su Banyosu	33
3.1.2.8. pH Metre	33
3.1.2.9. Vorteks	33
3.2. Çalışma Planı	33
3.3. SO ₂ Uygulanması ve doz belirlenmesi.....	34
3.4. Kültür işlemleri	34
3.5. Besi Yerlerinde Kükürt Dioksit Konsantrasyonlarının Ölçülmesi	34
3.6. Kardeş Kromatid Değişimini ve Kromozom Aberasyonlarını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler	36
3.6.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması	36
3.6.2. KKD Preparatlarının Boyanması	37
3.6.3. KA Preparatlarının Boyanması	38
3.6.4. Mikroskopik İnceleme.....	38
3.6.4.1. KKD ve Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması.....	38

3.6.4.1.1. KKD Sayısının Saptanması.....	38
3.6.4.1.2. Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması	39
3.6.4.2. Kromozom Aberasyonlarının ve Mitotik İndeksin Saptanması.....	41
3.6.4.2.1. Kromozom Aberasyonlarının Saptanması	41
3.6.4.2.2. Mitotik İndeks (MI)'in Saptanması	41
3.7. Mikronükleus (MN) Sıklığını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler.....	42
3.7.1. Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması.....	42
3.7.2. Preparatların Boyanması	43
3.7.3. Mikroskopik İnceleme	43
3.7.3.1. MN Sayısının Saptanması	43
3.8. İstatistiksel Analiz.....	44
4. BULGULAR	45
4.1. Besiyerlerinde SO ₂ miktarı değişimi.....	45
4.2. SO ₂ 'nin Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri.....	46
4.3. SO ₂ 'nin Kromozom Aberasyonları Oluşumu Üzerindeki Etkileri.....	48
4.4. SO ₂ 'nin Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri	53
4.5. SO ₂ 'nin DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri	55
5. TARTIŞMA	56
5.1. SO ₂ 'nin Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi.....	58
5.2. SO ₂ 'nin insan Lenfosit Hücrelerinde Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri.....	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BrdU : 5-Bromo-2 deoxyuridine

Cyt-B : Cytochalasin B

FAO/WHO : Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesi

KA : Kromozom Aberasyonu

KKD : Kardeş Kromatid Değişimi

MI : Mitotik İndeks

MN : Mikronükleus

RI : Replikasyon İndeksi

SO₂ : Kükürt dioksit

UNEP : Birleşmiş Milletler Çevre Koruma Ajansı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kükürt Dioksit Konsantrasyonu ile Akciğer Hastaları Arasında İlişki	10
Şekil 2.2. Taylor ve arkadaşlarına göre radyoaktif timidin varlığında DNA replikasyonu	18
Şekil 2.3. Deoxytimidi ve Bromodeoxyuridin'in halkasal yapıları	19
Şekil 2.4. BrdU' nun DNA yapısına girmesi ile 1. 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması	24
Şekil 2.5 Mikronükleus oluşumu a) Anafazda geri kalan kromozomların oluşturduğu MN b) Asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan MN ve sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu	28
Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi	399
Şekil 3.2. Birinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları	40
Şekil 3.3. İkinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları	40
Şekil 3.4. Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları ..	41
Şekil 4.1. Minimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde 1 KKD	477
Şekil 4.2. Orta dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde 1 KKD	47
Şekil 4.3. Maksimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KKD	488
Şekil 4.4 Minimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatit kırığı	499
Şekil 4.5 Orta dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatit kırığı	50
Şekil 4.6. Maksimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde kromatit kırığı	50
Şekil 4.7. Minimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde disentrik oluşum	511

Şekil 4.8. Orta dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde disentrik oluşum.....	51
Şekil 4.9. Maksimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde disentrik oluşum.....	522
Şekil 4.10. Maksimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde poliploidi	52
Şekil 4.11. Orta dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde Mikronükleuslu içeren binükleer hücre	544
Şekil 4.12. Maksimum dozda SO ₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde iki Mikronükleuslu içeren binükleer hücre	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1. Kükürt elementinin periyodik cetvelde gösterimi	4
Tablo 2.2. Kükürt Dioksitin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi	12
Tablo 2.3. Kükürt dioksitle İlgili Sınır Değerleri.....	13
Tablo 3.1. Çalışma Planı	33
Tablo 4.1. Farklı dozlarda uygulanan SO ₂ 'nin Analytik Jena Multi EA UV Dedektörlü Kükürt Tayin Cihazında Ölçülmesi	45
Tablo 4.2 Değişik dozlarda SO ₂ 'nin 72 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde hücre başına düşen ortalama KKD sayısı.	46
Tablo 4.3. Değişik dozlarda muamele edilen insan periferal lenfositlerinde KA yüzdesi.....	49
Tablo 4.4. Değişik dozlarda 72 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde MN'li binükleer hücre.	53
Tablo 4.5. Değişik dozlarda muamele edilen insan periferal lenfositlerinde RI ve MI	55

1. GİRİŞ

Malatya ve yöresi kayısı yetiştiriciliğın önemli merkezidir. Kayıslarda kuruma sırasındaki renk kararmalarını önleyerek tabii rengini korumak, kuruma süresini kısaltmak, böceklenmeyi önlemek ve muhafaza süresini artırmak amacıyla kükürtleme (islitleme) işlemleri yapılmaktadır. İslitleme genellikle kayısı bahçelerine inşa edilen, iyi izole edilmiş kükürtleme odalarında (islime odası) gerçekleştirilir. Bu işlem sırasında kayıslar 8-10 saatlik bir süre boyunca SO_2 'e maruz bırakılır. İşlem bittiğinde, kükürtleme odasının kapısı açılır ve yaklaşık 30-60 dakika süreyle oda havalandırılır. Bu sürede odanın çevresine yoğun olarak SO_2 gazı yayılır. Kükürtleme işlemi her yıl temmuz ayı boyunca yapılır. Bunun yanı sıra kayısı işleme ve paketleme fabrikalarında işçiler yılın her döneminde kükürt ve SO_2 gazına maruz kalmaktadır (1).

Kükürt ve kükürt türevleri havaya karışarak akut ya da kronik zehirlenmelere neden olmaktadır. Bazı iş kollarında çalışan işçilerin maruz kaldıkları iritan bir gaz olan SO_2 aynı zamanda hava kirliliği oluşturan gazlardan birisi olması nedeniyle çok daha fazla sayıda insanı etkileyebilme potansiyeline sahiptir. Kükürt göz, solunum ve sindirim mukozaları için iritandır. Yoğun maruz kalmalarda karın ağrıları, kusmalar ve diyare oluşur. Seyrek olarak methemoglobinemi ya da metabolik asidoz oluşturur (2). Bununla birlikte konjonktivit, korneal hasar, katarak, sinüzit, amfizem, trakeobronşit, bronşektazi gibi semptomlar görülür (3). SO_2 gibi suda çok çözünür gazlar, genellikle burundan daha uzağa geçemediklerinden toksisiteyi düşüktür. Buna karşın, partiküller ve aerosoller üzerine absorbe olduğunda, nazofarenks bölgesini aşp akciğer derinliklerine ulaşarak zararlı etkiler oluşturabilmektedir (2). Epidemiyolojik çalışmalar akciğer kanseri de dâhil olmak üzere solunumla ilgili birçok hastalığın SO_2 ile ilişkili olduğunu göstermektedir (4,5).

Genotoksisite testleri, etki mekanizmalarına göre *in vivo* veya *in vitro* olmak üzere iki grupta incelenmektedir (6,7). Genotoksisite testleri moleküler ve kromozom düzeyinde olabilmektedir. Moleküler düzeydeki genotoksisite çalışmalarında; DNA hasarının direkt belirlemek için yapılan Komet testi, tamir edilebilir DNA hasarının belirlenmesinde Programlanmamış DNA Sentezi (UDS), Ames testi ve *Drosophila* testleri kullanılmaktadır. Kromozom düzeyinde genotoksisite araştırmalarında ise

sitogenetik testler olan kardeş kromatid değişimi (KKD), kromozom aberasyonları (KA) ve mikronükleus (MN) analiz metotları kullanılmaktadır. KKD, DNA çift zincir kırıklarının homolog rekombinasyon ile onarılmasını gösteren, kardeş kromatidlerin homolog lokusları arasında DNA replikasyon ürünlerinin değişimidir (8). Kromozom aberasyonlarının ortaya çıkmasına DNA düzeyindeki bir hasar neden olabildiği gibi DNA'daki çift zincir kırıklarının onarılamaması ya da yanlış onarılmasına neden olabilmektedir (9). Genetik materyalde oluşan hasar, MN oluşum sıklığı ile değerlendirilmektedir. MN'ler, hücrenin mitoz bölünmesi esnasında oluşan, esas çekirdeğe dâhil olmayan, sentrik veya asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır (10,11).

SO₂'nin birçok *in vitro* ve *in vivo* olarak genotoksik ve sitotoksik olabileceği test sistemleri kullanılarak gösterilmiştir (4, 12-18).

Bu çalışmada Malatya ve yöresinde kuru kayısı üretiminde yaygın olarak kullanılan SO₂ gazının farklı konsantrasyonlarda insan lenfositlerine olası genotoksik etkileri, *in vitro* şartlarda, KKD, MN, KA, MI ve RI gibi sitogenetik parametreleri kullanarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kükürt'ün Tarihçesi

Kükürt eski zamanlardan beri bilinen kimyasal bir maddedir. Pagan kabilelerinin, şeytan ruhlarını kovmak için kükürt yaktıkları bilinmektedir (19). Kükürdün kimyasal bir element olduğu 1777'de Lavoisier tarafından ortaya atılmıştır. 1810'a doğru Gay Lussac ile Thenard tarafından deneysel olarak doğrulanmıştır. Uzun bir süre Fransız bir şirket, Sicilya'daki kükürt yataklarından kükürt üretimi yaparak dünya kükürt ticaretinde önemli bir rol oynamıştır. 1914'den önce Amerika'da Gulf bölgesinde kükürt yatakları bulunmasına rağmen kükürt yataklarının üzerinde bulunan kum tabakaları dolayısıyla kükürt yataklarını işletmek güç olmuştur. SO₂'nin türevi olan sülfürik asit (H₂SO₂) 1914'den önce ABD'de piritin kavrulmasıyla ve bakır hanelerden elde edilen SO₂'den üretilmiştir. Louisiana ve Texas yataklarının işletilmesi Frasch prosesi sayesinde olmuştur (19). Bugün dünyadaki kükürt üretiminin büyük oranı Frasch prosesi ile Louisiana ve Texas'dan yapılmaktadır (19).

2.2. Kükürt'ün Kimyasal Özellikleri

Kükürt tatsız, kokusuz bir katıdır, ısı ve elektriği iyi iletmez. Kükürt ısıtıldığında 113° C dereceye doğru eriyerek açık sarı bir sıvı verir, 220°C dereceye doğru kararır ve akışkanlığını yitirir. Suda çözünmemesine karşın benzende hafifçe çözünür ama en önemli çözücüsü karbon sülfürdür.

Kükürt kimyasal olarak oksijenle birçok benzerlik gösterir ve bileşmelerde oksijenin yerine geçer. Ancak daha az elektronegatifdir. Metaller, oksijenle olduğu gibi kükürt buharında yanarak sülfürleri meydana getirir. Demir talaşı ve kükürt çiçeği hafifçe ısıtıldığında akkor hale gelerek yapay demir sülfürüne dönüşür. Kükürt, oksijen ve halojenlere karşı elektropozitifdir. Reaksiyon verme kabiliyeti oldukça iyi olup soy gazlar hariç diğer elementlerin hepsi ile reaksiyon verir. Kütle numaraları 29 ile 38 arasında değişen dokuz izotopu vardır.

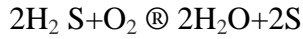
Tablo 2.1. Kükürt elementinin periyodik cetvelde gösterimi

Kükürt (S)																	
<u>H</u>																	<u>He</u>
<u>Li</u>	<u>Be</u>											<u>B</u>	<u>C</u>	<u>N</u>	<u>O</u>	<u>F</u>	<u>Ne</u>
<u>Na</u>	<u>Mg</u>											<u>Al</u>	<u>Si</u>	<u>P</u>	<u>S</u>	<u>Cl</u>	<u>Ar</u>
<u>K</u>	<u>Ca</u>	<u>Sc</u>	<u>Ti</u>	<u>V</u>	<u>Cr</u>	<u>Mn</u>	<u>Fe</u>	<u>Co</u>	<u>Ni</u>	<u>Cu</u>	<u>Zn</u>	<u>Ga</u>	<u>Ge</u>	<u>As</u>	<u>Se</u>	<u>Br</u>	<u>Kr</u>
<u>Rb</u>	<u>Sr</u>	<u>Y</u>	<u>Zr</u>	<u>Nb</u>	<u>Mo</u>	<u>Tc</u>	<u>Ru</u>	<u>Rh</u>	<u>Pd</u>	<u>Ag</u>	<u>Cd</u>	<u>In</u>	<u>Sn</u>	<u>Sb</u>	<u>Te</u>	<u>I</u>	<u>Xe</u>
<u>Cs</u>	<u>Ba</u>		<u>Hf</u>	<u>Ta</u>	<u>W</u>	<u>Re</u>	<u>Os</u>	<u>Ir</u>	<u>Pt</u>	<u>Au</u>	<u>Hg</u>	<u>Tl</u>	<u>Pb</u>	<u>Bi</u>	<u>Po</u>	<u>At</u>	<u>Rn</u>
<u>Fr</u>	<u>Ra</u>		<u>Rf</u>	<u>Db</u>	<u>Sg</u>	<u>Bh</u>	<u>Hs</u>	<u>Mt</u>	<u>Ds</u>	<u>Rg</u>	<u>Uub</u>	<u>Uut</u>	<u>Uuq</u>	<u>Uup</u>	<u>Uuh</u>	<u>Uus</u>	<u>Uuo</u>
			<u>La</u>	<u>Ce</u>	<u>Pr</u>	<u>Nd</u>	<u>Pm</u>	<u>Sm</u>	<u>Eu</u>	<u>Gd</u>	<u>Tb</u>	<u>Dy</u>	<u>Ho</u>	<u>Er</u>	<u>Tm</u>	<u>Yb</u>	<u>Lu</u>
			<u>Ac</u>	<u>Th</u>	<u>Pa</u>	<u>U</u>	<u>Np</u>	<u>Pu</u>	<u>Am</u>	<u>Cm</u>	<u>Bk</u>	<u>Cf</u>	<u>Es</u>	<u>Fm</u>	<u>Md</u>	<u>No</u>	<u>Lr</u>
Temel özellikleri																	
Atom numarası	16																
Element serisi	Ametaller																
Grup, periyot, blok	16, 3 , p																
Görünüş	Limonsarı																
																	
Atom ağırlığı	32,066 g/mol																
Fiziksel Özellikleri																	
Maddenin hali	Katı																
Yoğunluk	2070 g/cm ³																
	717,75°K																
Kaynama noktası	444,75°C																
	832,55 °F																

Kükürt doğada yaygın olarak bulunan bir elementtir. Bir kısmı elementel hâlde; bir kısmı ise bileşik hâindedir. Yerkürenin % 0.052'sini oluşturur. En önemli kükürt yataklarının bulunduğu Sicilya, Louisiana ve Japonya'da eski volkanların yakınında, alçı taşı ya da kireç taşı katmanları arasında doğal halde bulunur. Elementel hâlde, Türkiye'de, Amerika'da, İtalya ve İspanya'da bulunur. Yurdumuzdaki en önemli kükürt yatağı Keçiborlu'dadır.

Çoğunlukla metallerle birleşmiş olarak görülür; demir, bakır, kurşun, çinko sülfürler ve kalsiyum sülfat bu metallerin en önemli cevherleridir.

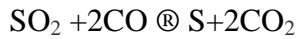
Maden kömürlerinin destilasyonu sırasında oluşan hidrojen sülfür (H_2S) oksijen ile reaksiyona girerse elementel kükürt elde edilir:



Pirit (FeS_2) önemli bir kükürt kaynağıdır. Piritten elde edilen kükürt dioksit hidrojen sülfür ile reaksiyona girerse serbest kükürt elde edilir:



Kükürt dioksit, karbon monoksit ile reaksiyona sokulursa yine kükürt elde edilir:



Kükürt oda sıcaklığında sadece flour ve civa ile reaksiyon verebilir. En önemli bileşiği sülfat asidi (H_2SO_4)'dir. Kükürt dioksitin su ile reaksiyonundan sülfat asidi elde edilir:



Sülfat asidi; yoğunluğu $1,03 \text{ g/cm}^3$ olup suda çözünen ve kendisine has bir kokusu olan renksiz bir sıvıdır. Kararsız olup hava ile okside olarak H_2SO_4 'e dönüşebilirken SO_2 fazlalığı nedeniyle bozunabilir. Organik bileşiklerin sentezinde, analitik kimyada, saman ve kumaşların ağartılmasında, kâğıt sanayinde beyazlatıcı olarak, metalurjide, meyve ve yiyeceklerin saklanmasında, parafinlerin rafinasyonunda ve sülfat bileşiklerinin elde edilmesinde kullanılır.

Kükürt monoklorür (dikükürtdiklorür) formülü S_2Cl_2 olan, iyi bir kükürt halojen bileşimidir. Erimiş kükürt içinden klor gazı geçirilerek elde edilir. Sarımsı-kırmızı renkte olup, keskin pis bir kokusu vardır. $-82^{\circ}C$ 'de donar ve $138^{\circ}C$ 'de kaynar. Su ile kolayca çözünebildiği gibi organik çözücülerde de çözünür. Organik maddelerin ve bazı yağların klorlandırılmasında, mobilyada kullanılan kuruyan yağların elde edilmesinde, yağların ve kauçuğun soğuk vulkanizasyonunda, silah yapımında, böcek öldürücü olarak ve şekerin saflaştırılmasında kullanılır.

Tiyonil klorür; kükürt oksiklorür olarak da bilinir, formülü $SOCl_2$ 'dir. Organik sentezlerde klorlama vasıtası olarak, A vitamininin, antihistaminiklerin, boyaların elde edilmesinde kullanılır. Renksiz ya da kırmızı sıvıdır. Deriyi yakar ve su ile bozunur. Buharı da sağlık için zararlıdır.

2.3. Kükürt Dioksit (SO_2) Gazı

Kükürt dioksit ise; renksiz, boğucu ve asidik bir gazdır. Kimyasal formülü SO_2 olup, moleküler ağırlığı 64.054 g/mol, yoğunluğu 2.551 g/L, erime noktası $-72,4^{\circ}C$ (200,75 K), kaynama noktası $-10^{\circ}C$ (263 K), suda çözünürlüğü 9.4 g/100 mL ve asitliği (pKa) 1.81'dir.

Suda bol miktarda çözünerek sülfid asidini meydana getirir. Alkol ve eterde çözünür. $0^{\circ}C$ ' de spesifik giavitesi 1,43'tür. Sıvı SO_2 elektrik akımı iletmez. Atmosfer basıncında $-10^{\circ}C$ ' de kaynar (20).

Atmosferik SO_2 'nin yaklaşık yarısı doğal emisyonlardan kaynaklanmaktadır (UNEP,1994). SO_2 ; kömür ve fuel-oilin yapısında doğal olarak bulunan kükürt bileşiklerinin yanması, endüstriyel prosesler, ısınma amaçlı kullanılan evsel yakıtlar, termik santraller ve belli bir miktar da dizel yakıtlı taşıtların kullanımı sonucu açığa çıkmaktadır. SO_2 ' nin atmosferik konsantrasyonları, evsel ısıtma amacıyla kömür kullanımının yaygın olduğu şehirlerde ve endüstriyel alanların çevresinde yüksektir (21).

2.3.1. Kükürt ve Kükürt dioksit'in Kullanım Alanları

Kükürdün yaygın bir kullanım alanı vardır. Ham kükürdün büyük bir kısmı, kükürt dioksit gazı, sülfürik asit, karbon sülfür, tiyosülfat vb. üretiminde kullanılır. Sülfürik asit üretiminde yılda tonlarca kükürt kullanılmaktadır (22).

Arı kükürt, kara barut, havai fişek ve kibrit yapımında, kauçuğun kükürtlenmesinde, ebonit üretiminde, bağlarda görülen külleme hastalığına karşı yapılan kükürtleme ile deri hastalıklarının tedavisi için hazırlanan pomat ve şampuanların yapımında kullanılır. Kükürt, hem dâhilen hem de haricen kullanılan bir halk ilacıdır. Uyuz ve egzamada mangal külüyle karıştırılan kükürt, zeytinyağıyla karıştırılarak hasta bölgeye sürülür. Alerjiye karşı toz kükürt, leblebi unu ya da balla karıştırılarak hastaya yedirilir. Yanıklarda bir miktar kükürt kireçle karıştırılıp pomat haline getirilerek deriye sürülür. Kulak hastalıklarının tedavisinde ve ayrıca gebeliğin sonlandırılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca Anadolu'nun bazı yörelerinde hayvan uyuzunda ve hayvanların mide bağırsak parazitlerini düşürmede de yararlanılmaktadır.

Dörde bir oranında kükürt ve kurşun asetat karıştırılarak oluşturulan madde, bitkisel parazitlere ve haşarata karşı kullanılır. Tıpta ilaç yapımında kullanılan kükürt, lastik endüstrisinde lastiklerin sertleştirilmesinde önemli bir yer tutar (22). Dıştan sürüldüğü zaman (losyonlar, merhemler) asalakları öldürücü, seboreyi giderici ve keratin eritici özellikler gösterir. Birçok maddenin molekülerinde bir ya da birçok kükürt atomu bulunması bu maddelere bakteri öldürücü özellikler kazandırır.

Kişi başına düşen yıllık kükürt tüketimi Amerika'da 45 kg, Avrupa'da ortalama 32 kg, Hindistan'da 0,9 kg'dır. Üretilen kükürdün % 86'sı sülfat asit üretiminde, bu asidin de % 47'si gübre imalatında kullanılır. Çelik ve petrol sanayindeki işlemlerde, kauçuk üretiminde, boyalarda, sentetik fiber üretiminde, katalizör olarak deterjan, sentetik reçine birçok organik ve anorganik maddelerin yapımında kullanılır. Ziraatta böcek ve mantar öldürmede ve radyoizotop olan S-35 birçok bilimsel araştırmada kullanılır (23). Yağların ve yiyeceklerin beyazlatılmasında, etlerin saklanması, kimyasal maddelerin elde edilmesinde, kağıt üretiminde, soğutmada ve camların tavlanması kullanılır (23).

SO₂ ilk çağlardan beri koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Kuru meyveler, meyve suları, bazı şarap türleri, reçel ve marmelat gibi meyve ürünlerinde kullanılan en önemli koruyucu maddedir. Gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılır ve numarası E 220'dir. Gıdalardaki renk bozulması reaksiyonlarını engeller (özellikle kayısı ve şeftali kuruları sülfür dioksit ile doğal renklerini korurlar) ve

mikroorganizmaların üremesini önler. Asitli gıdalarda etkinliği en fazladır. Nötr pH'ta etkisizdir. C vitamini kaybını engellerken, B1 ve E vitaminlerini oksitlenmeye bağlı olarak azaltır.

Hammaddeye eklenen sülfür dioksit, daha sonra ürünün işlenmesi esnasında ısı ilemlerle üründen gaz olarak ayrıştırılır. Böylece son üründe sülfür dioksit oranı yasa ve tüzüklerde izin verilen düzeyde kalmaktadır. Fazla alındığında toksik etki yapar ve eklendiği gıdanın tadını etkiler, bu nedenle gıdalarda kullanımı gıda çeşitlerine göre sınırlandırılmıştır (24). Sucuk, sosis, salam gibi et ürünlerinde bakteriyel üremeyi önlemek için kullanılır. Çiğ et ve tavuk etinde kullanımı çoğu ülkede yasaktır. Sirke, turşu, salamuralar, patates cipsi, asitli meyve suyu üretimlerinde de sülfür dioksit koruyucu olarak kullanılır (24).

İlaç endüstrisinde de kullanılmaktadır; bazı aerosol ilaçlar ile bulantı ve kusmalarda kullanılan metoklopramid (metpamid) ampulleri bileşiminde sülfür dioksit mevcuttur. Soğutma sistemlerinde soğutucu olarak kullanılır.

Dezenfektan gaz olarak, böcek ve mantar öldürücü ilaç içeriklerinde, sülfürik asit ve diğer kimyasalların üretiminde, kâğıt üretiminde beyazlatıcı madde olarak ve tekstilde liflerin ağartılmasında kullanılır (24).

2.3.2. Kükürt Dioksit'in Toksik Etkileri

Fizyolojik sınırdaki kükürt molekülleri; Bağ dokusu, deri, tırnak üretimi, kan şekeri seviyesinin kontrolü, vücudun zehirlerden arınması, safra üretimi, sağlıklı saç ve cilt için gereklidir. Oksijen dengesinin korunmasına yardımcı olur, bu da beyin fonksiyonları için çok önemlidir. Ayrıca B-grubu vitaminlerinin işlevlerini yerine getirmesine ve karaciğerde safranın salgılanmasına yardımcı olur.

SO₂; hava kirliliği olan yerleşim bölgelerinde, sanayi bölgelerinde, yanardağ çevrelerinde, SO₂ kullanılan gıda sanayinde ve laboratuvar şartlarında solunum yoluyla da insanları etkilemektedir. SO₂ az miktarda dahi keskin kokusuyla hissedilen bir gazdır. İnsanların gaz olarak SO₂'ye tepkisi farklıdır (25,26). Kış aylarında atmosferde SO₂ artışıyla birlikte akut astım atakları başta olmak üzere solunum sistemi şikâyetleriyle hastaneye başvuranlarda artış görülmektedir (27,28). KOAH sebebiyle oluşan mortalite verileri ile hava kirliliği parametreleri arasında korelasyon gözlenmektedir (27,28). Şehirlerde ısınmada katı ve sıvı yakıt

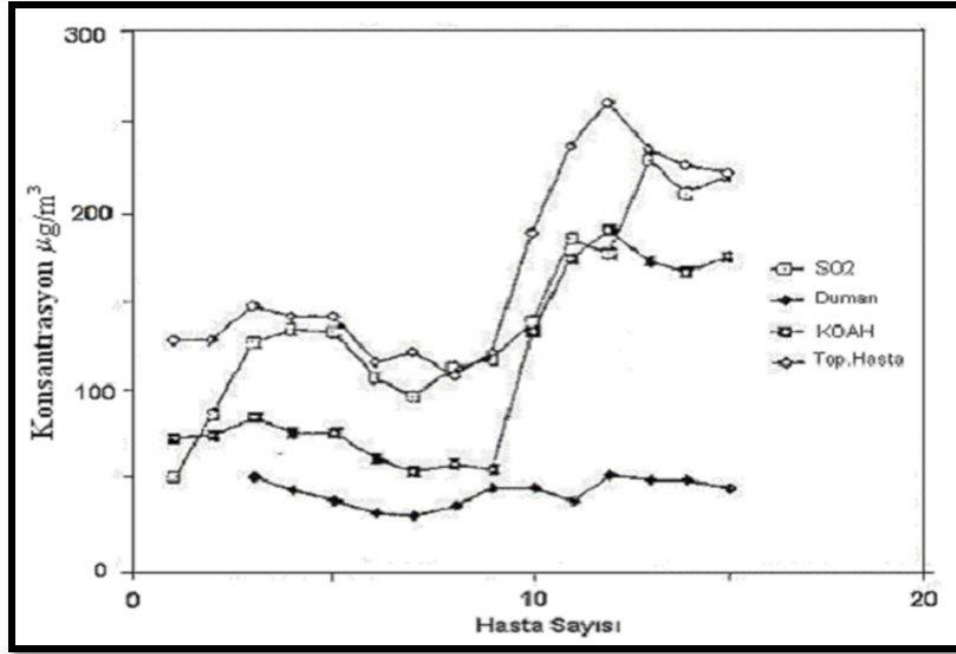
kullanılması, hava kirliliğinin artması, partikül madde ve kükürt dioksit konsantrasyon artışı ile solunum yollarına ilişkin şikayetler hatta buna bağlı ölüm olayları arasında ciddi bir ilişki vardır (29).

SO₂ asidik ve suda çözünebilen bir gaz olup nemli burun mukozası ve solunum yollarından çok hızlı bir şekilde absorbe edilir. Mukoza yüzeyi ile temas ettiğinde hızla kükürde ve sülfirik aside dönüşerek solunum sistemindeki sınırlara hasar verir. Bu hasar sonucu refleks öksürük krizleri, göğüs sıkışması meydana gelir. Özellikle astım, kronik akciğer hastalığı bulunan kişilerde solunum yollarının daralmasına ve kronik solunum hastalığına neden olur (29). 10 ppm'den yüksek yoğunlukta göz, burun, boğaz irritasyonu ve göğüs ağrısı şikâyetlerine yol açarken daha yüksek yoğunlukta korneada yanık, üst solunum yollarında ciddi irritasyon ve alveolar hemorajiye sebep olmaktadır (30, 31, 32). SO₂'nin atmosferdeki konsantrasyonu 357 µg/m³ (saatlik değer) üzerine çıktığında astımlı kişilerde göğüs daralması, öksürme ve akciğer fonksiyonunda semptomlar görülürken, konsantrasyonun pik noktasına ulaşmasıyla geçici solunum güçlüğü görülür. Havadaki 0.25 ppm (655 µg/m³) SO₂'e 10 dakika maruz kalınması durumunda ise solunum sistemi hasarının olduğu ve nefes alma kapasitesinde önemli düşüşler meydana geldiği tespit edilmiştir.

Tavşanlarda yapılan bir çalışmada, SO₂ absorpsiyon oranının, sülfür dioksit konsantrasyonundan da etkilendiği görülmüştür. Köpeklerde yapılan deneylerde SO₂ tutulumunun en fazla trakea, akciğerler, böbrek ve özefagusta olduğu respiratuar sistemdeki bu sülfitin haftalarca kaldığı ve yavaş yavaş idrarla atıldığı görülmüştür (33). SO₂ gazı ve sülfidler bronkokonstriksiyon yaparak solunum sistemi semptomlarına neden olmaktadır (27). Vücuda alınan serbest sülfid, karaciğerde sülfid oksidaz enzimi ile sülfata çevrilip idrar yolu ile kolayca atılmaktadır. İnsanlarda inhale edilen SO₂'nin %12-%15'i solunumla, primer olarak ise idrarda sülfat olarak atılır. Köpeklerde ve insanlarda SO₂ verildiğinde idrarla atılan sülfat miktarının arttığı görülmüştür (33).

İstanbul'da yapılan bir çalışmada, kükürt dioksit ve partikül madde konsantrasyonları ile akciğer ve solunum yolları rahatsızlıkları sebebiyle hastanelere yapılan müracaat sayısı arasındaki korelasyon Şekil 2.1'de verilmiştir. Görüldüğü

gibi, SO₂ konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak akciğer ve solunum yolları hastalıklarında artış gözlenmiştir (29).



Şekil 2. 1. Kükürt Dioksit Konsantrasyonu ile Akciğer Hastaları Arasında İlişki (29)

SO₂ geçmişte çok yüksek konsantrasyonlarda insan ölümlerine neden olmuştur. 1930 yılında, Belçika'da Meuse vadisinde yaşayan insanlar bölgedeki çelik, çinko, cam fabrikalarının neden olduğu 2600 mgr/ m³ yoğunluğundaki SO₂'e üç gün boyunca maruz kalması sonucunda (34) 63 kişi ölmüştür. 26 Ekim 1948'de Pennsylvania eyaletindeki Donora kasabasındaki benzer bir olayda ise 23 kişi hayatını kaybetmiştir (35).

5-8 Aralık 1952'de Londra'da üç gün boyunca 38030 mgr/ m³ SO₂ konsantrasyonuna maruz kalan 4000 kişi ölmüştür (33). Bu olay sonucu İngiltere'de temiz hava kanunu yayınlanmış ve ısınmada kullanılan yakıt özelliğinde ve yakma sistemlerinde ciddi iyileştirmeler yapılmıştır. İnsan sağlığını bu kadar olumsuz etkileyen SO₂ gazı ile ilgili olarak pek çok çalışma yapılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda çok yüksek konsantrasyonlarda SO₂ gazı kullanılmıştır. Bu çalışmalarda SO₂'nin refleks bronkokonstrüksiyona ve hava yollarında hücresel hasara yol açtığı sonrasında ise goblet hücrelerinde proliferasyona neden olduğu görülmüştür. Buna göre SO₂'nin

yüksek dozlarda (500 mgr/ m^3 'den yüksek) laboratuvar hayvanlarında bronşit ve hava yolları hasarına yol açtığı belirlenmiştir (36).

Yüksek konsantrasyondaki SO_2 'e kısa süreli de olsa maruz kalınması hayati önem taşımaktadır. Bakır madenlerinde çalışan ve sigara içmeyen işçilerde, madende patlama sonucu burun ve boğazda yanma, nefes almada zorluk, ağır hava yolu obstrüksiyonu görülmüştür. Epidemiyolojik çalışmalar yoğun hava kirliliğine kısa süreli maruz kalınması durumunda bile mortalitenin arttığını göstermektedir (33). SO_2 gazı akciğerler dışında nasal mukoza ve konjunktivaya da toksiktir. SO_2 gazına uzun süreli maruz kalma ile nasal mukozada epitelyum dejenerasyonu, mukus glandlarında azalma ve nasal hava yolu direncinin arttığı gösterilmiştir (27,37).

SO_2 gazının direk toksik etkisiyle gözde iritasyon oluşturduğu bildirilmiştir (27). SO_2 immün sistem fonksiyonlarını da etkilemektedir. Borska ve arkadaşları (38) 3 saat boyunca 400 ppm SO_2 'ye maruz kalmanın akciğerde makrofaj aktivitesini kaybetmediğini gösterirken, Sandstrm ve arkadaşları (39) 4 ppm SO_2 'ye uzun süre maruz kalınması ile alveolar makrofaj aktivitesinde ve sayısında artışa neden olduğunu göstermiştir. Buna karşılık dinlenme ve egzersiz durumunda SO_2 'ye maruziyetin makrofaj endositoz aktivitesini azalttığını belirtilirken, Jakab ve ark.ları da (40) SO_2 ihalasyonunun alveolar makrofaj fagositoz aktivitesini azattığını göstermişlerdir.

SO_2 kana geçtiği ve sistemik etkisinin de olduğu gösterilmiştir (41). Bununla birlikte lokal etkisinin yanı sıra sistemik olarak da immün sistemi etkilediğini ve baskılayıcı etkisinin diyabete göre daha fazla olduğunu göstermektedir.

Yapılan bir çalışmada SO_2 konsantrasyonunun artmasıyla kalp atım hızı değişimini arttırdığı (42) ve SO_2 'ye maruz kalınması durumunda plazma viskozitesinde de günlük değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (33). Bu bulgular havadaki artmış SO_2 'nin hemodinamik bozukluklara bunun sonucunda kardiyovasküler ve inme gibi diğer dolaşım hastalıklarına neden olabileceğini göstermektedir. Akut iskemik inme mortalitesinde SO_2 maruziyetinin anlamlı etkileri olduğu saptanmıştır (43).

Konsantrasyon değişiminin maruz kalma süresine bağlı olarak insan sağlığı üzerinde yaptığı olumsuz etkiler Tablo 2.2'de verilmiştir (29).

Tablo 2. 2. Kükürt Dioksitin İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi

SO ₂ (ppm)	Maruz Kalma Süresi	Etkileri
0.037- 0.092	Yıllık ortalama	185 µg/m ³ duman konsantrasyonu ile birlikte, solunum yolları ve akciğer hastalıklarında artışlar.
0.007	Yıllık ortalama	Yüksek partikül konsantrasyonu ile birlikte, çocuklarda solunum yolları hastalıklarında ilerleme.
0.11-0.19	24 saat	Düşük partikül konsantrasyonunda, yaşlı kimselerde solunum yolları hastalıklarında artış.
0.19	24 saat	Büyüklerde kronik solunum yolları hastalıklarında ilerleme.
0.19	24 saat	Düşük partikül konsantrasyonunda, ölüm oranlarında artış görülebilir.
0.25	24 saat	750 µg/m ³ duman konsantrasyonu ile birlikte, günlük ölüm oranlarında artış görülebilir (İngiltere). Hastalanmalarda ani artış.
0.5	10 dakika	Astım hastalarında egzersiz (hareket) halinde solunum direncinin artması.
5	24 saat	Sağlıklı kimselerde solunum direncinin artması.
10	10 dakika	Bronkospasm.
20		Göz tahrişi, öksürme

Gıdalarla alınan SO₂ yıllardır gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı için zararlı etkileri detaylı bir şekilde araştırılmıştır (25,44). FAO/WHO Gıda Katkı Maddeleri Ortak Uzmanlar Komitesinin araştırmalarına göre SO₂ için günlük alınabilir kabul düzeyi 0.7 mg/kg/gündür. Vücut ağırlığı 70 kg olan bir kişi için 49 mg kadar SO₂ alınabileceği belirtilmektedir (45).

SO₂ duyarlılığı bireylere göre değişmektedir. Vücut ağırlığına göre 13-14 mg/kg' dan fazla alınan sülfidlerin boğaz ve mide yanmaları, baş ağrısı ve kusma gibi toksik etkiler oluşturabildiği görülmüştür (27). Buckley ve arkadaşları astımlıların % 4.6'sında sülfid duyarlılığı olduğunu göstermişlerdir. Fakat kuru kayısıda toplam SO₂'in çok az oranda serbest sülfid içermesi bu riski azaltmaktadır (45). Besinlerdeki sülfidin, kanserojen mikotoksinler, aflatoksin B, M ve G yanında patulini de ortadan kaldırma özelliği vardır (27,45).

SO₂ ve sülfid için saptanan LD50 (akut toksik etki göstergesidir, deneklerin %50'sinde ölüme neden olan minimum miktarı ifade eder) değeri 1000 mg/kg'dır (27).

Türkiye, Dünya Sağlık Teşkilatı ve A.B.'nin SO₂ için koyduğu sınır değerler Tablo 2. 3'de verilmiştir (29).

Tablo 2. 3. Kükürt dioksitle İlgili Sınır Değerleri

Ülkeler	Koruma Gerekçesi	Ortalama Süre	Limit Değer	Marjinal Tolerans
Türkiye		24	400 µg/m ³	
Avrupa Topluluğu (A.B.)	İnsan Sağlığını Korumak	1 saat	350 µg/m ³	Bir yıl içinde 24 defadan fazla olamaz
	Halk sağlığını Korumak	24 saat	125 µg/m ³	Bir yıl içinde üç defadan fazla bu değer aşamaz
	Ekosistem	Yıllık Kış ayı	20 µg/m ³	
Avustralya		1 saat 24 saat Yıllık	0.2 ppm 0.08 ppm 0.02 ppm	
Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO)		10 dakika 24 saat yıllık	500 µg/m ³ 125 µg/m ³ 50 µg/m ³	
A.B.D. EPA		Yıllık 24 saat	80µg/m ³ 365µg/m ³	

Serbest radikallerin sitotoksitesi özellikle lipit, nükleik asit ve proteinleri okside edebilmesinden dolayıdır. SO₂'nin oluşturduğu serbest radikaller, nükleik asitlerde hasara sebep olabilir ve mutasyonu indükleyebilir. Bu da nükleik asitlerin hücrede reaktif oksijen radikalleri tarafından hedef alınan önemli bir makro molekül olmasından kaynaklanmaktadır. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asidin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısında yer alan purin ve pirimidin bazları, serbest radikallerin etkilerini gösterdiği bölgelerdir. Özellikle guanin bazının bu radikaller aracılığı ile hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyona neden olmaktadır. Beyindeki temel makro moleküller

genetik yapıların hasarı nedeniyle kretin kinaz (CK), tubulin, nöron spesifik enolaz (NSE) gibi beyin proteinlerinin sentezinin azaldığı ortaya konmuştur (33). Dahası, bu radikaller proteinlerle tepkimeye girebilir ve peptidlerin yapısında sulfitolisise sebep olabilir. Bunun sonucunda membran proteinleri değişebilir. Bu radikaller aynı zamanda lipitlerle de tepkimeye girebilir ve birçok dokuda lipit peroksidasyonuna yol açabilir (15). Yapılan birçok çalışmada SO₂ inhalasyonunun fare beyin ve eritrositlerinde lipit peroksidasyonunu arttırdığı görülmüştür (33). Lipid peroksidasyonun biyolojik membranların önemli bir bileşeni olan ansatura yağ asitlerinin peroksidasyona uğraması sonucu; biyolojik membrandaki fonksiyonel ve yapısal bozulmaların meydana gelmesine sebep olabilir. Dolayısıyla reseptörlere ve hücre membranındaki iyon kanallarına hasar verebilir (33). Bunun yanı sıra yaşlanma, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi pek çok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olduğu bilinmektedir (33,46).

SO₂'e maruz kalan farelerde enfeksiyon sıklığı ve şiddetinin artmış olduğu görülmüştür. Bu etki bakterilerin öldürülme mekanizmasında rol alan antioksidan üretiminin azalmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.

SO₂ ve *invivo* türevleri olan bisülfid-sülfidin santral nöral hücrelerde toksik olduğu düşünülmektedir (46). Çin'de Beijing'de annenin üçüncü trimestırda maruz kaldığı sülfür dioksit ya da havadaki partiküller ile bebek doğum ağırlığı arasında anlamlı bir ilişki görülmüştür (47). Hong Kong'da nitrojen dioksit, sülfür dioksit, ozon ve 10 mikrometreden küçük partiküller olan dört hava kirleteni ile yapılan bir çalışmada, solunum sistemi hastalıkları ve kalp damar hastalıkları nedeniyle sağlık sorunları yaşayanlar arasında pozitif bir bağlantı olduğu belirlenmiştir (48).

Kanser, gen mutasyonları veya epigenetik mekanizmalar ile hücre büyüme, bölünme ve farklılaşma proseslerinin bozulması sonucu oluşan kontrolsüz hücre bölünmeleridir. Kromozom aberasyonları ile kanser oluşumu arasında yakın ilişki bilinmektedir (49). Sülfür dioksidin akciğer kanserinde rol oynayabileceği de bazı çalışmalarda öne sürülmüştür (33).

SO₂ inhalasyonu farelerin kemik iliği hücrelerinde kromozomal kırıklara ve mikronükleuslara yol açabilmektedir (50). SO₂ ve *invivo* türevleri ayrıca insan lenfositlerinde kardeş kromatit değişimine, kromozomal kırıklara ve mikronükleuslara neden olmaktadır (51). Bu çalışmaların ışığında, SO₂ in

kromozomal aberasyon oluşumunu indükleyen mekanizma ile ilgili birkaç olası yol düşünülmektedir. Birincisi; SO_2 nin yüksek konsantrasyonlarda memeli hücrelerindeki enzim kataliz yolu olarak bilinen sitozinin urasile deaminasyonu ve DNA'nın modifikasyonu ile kromozomal hasar meydana getirmesidir. İkinci muhtemel mekanizma; SO_3^- , SO_4^- ve SO_5^- gibi kükürt ve oksijen merkezli serbest radikallerin oluşumuyla ya da bisülfitin otoksidasyonu veya oksidasyonu katalizleyen enzim tarafından kromozomal hasar meydana geldiği düşünülmektedir (15).

2.4. Malatya'da Kükürt dioksit Kullanımı

Malatya ili; coğrafyası, toprak yapısı ve iklim özellikleri açısından birçok tarımsal faaliyetin yapılmasına uygun bir çevreye sahiptir. Malatya ekonomisinin temeli büyük oranda kayısı üretimine dayanmaktadır. Ülkemizde ticari olarak üretilen kuru kayısı üretiminin başlıca kaynağı, bu üretimin hemen hemen tamamını gerçekleştiren Malatya ilidir. Ayrıca, ekolojik özelliklerinden dolayı renk, tat, aroma ve kuru madde bakımından dünyanın en ünlü kayısıları Malatya ve çevresinde yetiştirilir. Malatya'da üretilen kayısıların yaklaşık %90-95'i hasat, kükürtleme, kurutma ve çekirdek çıkarma işlemlerinden geçtikten sonra Malatya'da bulunan çok sayıdaki entegre kayısı işleme tesislerinde işlenmekte ve başta bazı Avrupa ülkeleri olmak üzere 70'den fazla ülkeye ihraç edilmektedir. Bu ihracatta ilk sırayı ABD ve Avrupa Birliği ülkeleri almaktadır (52).

Kükürtleme odası 2.5 m en ve boyda, 2.2 m yükseklikte olup duvarları 30 cm kalınlıkta beton veya tuğladan yapılır. Kükürt odasının kapısı 110 cm genişlik, 200 cm yükseklikte, contalı ve hava geçirmez olmalıdır. Kükürtlemede kullanılan kükürdün saflık derecesi yeterli olmadığından yanması için bir kaptan ısıtılması gerekir. Isıtma işleminde kullanılmak amacıyla oda kapısının tam karşısında duvarın tabanla birleşen orta yerinde bir kükürt ocağının yapılması gerekir. Ocağın tabanla aynı seviyede olması kükürt gazının odaya homojen yayılmasını sağlar.

Toz kükürdün ertildiği madeni kap 25-30 cm çapında ve 5-6 cm derinliğinde olmalıdır. Böyle bir kaptan yarım kilo kükürt otuz dakikada, bir kilo kükürt elli dakikada, iki kilo kükürt doksan dakikada yanmaktadır. Raflara dizilen yaş meyveler

kükürt odasına yerleştirildikten sonra ocak üzerinde bulunan çinko veya madeni kaba belirli bir miktarda kükürt konularak ocak yakılır. Ocağın yanması ile birlikte kükürdün erimesi için bir tahta ile kaptaki kükürt karıştırılır. Kükürt eriyip mavi renk alınca erimiş kükürt tutuşturulur. Kükürt yanmaya başlayınca dışarı çıkılarak odanın kapısı kapatılır. Kükürtleme süresi kayısı çeşidi, meyve olgunluğu, meyvenin bütün veya ikiye bölünmüş olması ve ortam sıcaklığı etkilemektedir. Yaş meyvenin kükürdün yaklaşık yarısını birinci saatte aldığı saptanmıştır. Meyvenin kükürt absorbe hızı ilerleyen saatlerde azalmaktadır (53).

Tük Standartları Enstitüsünce 01/08/1993 tarihinde yürürlüğe giren TS/485 Kuru Kayısı Standardı ile yalnız ihracata yönelik olarak kükürt ve nem oranları %0.25 ve %25 olarak belirlenmiştir (54,55).

Kuru kayısı ithal eden ülkelerin de kendilerine özgü standartları vardır. Bazı ülkelerin kuru kayısı ithalatında kabul ettikleri maksimum SO₂ oranları ppm olarak aşağıdaki gibidir (56).

Almanya	: 2000	ppm
İngiltere	: 2000	ppm
İtalya	: 2000	ppm
Fransa	: 2000	ppm
Avustralya	: 3000	ppm

Malatya ve yöresinde yapılan kükürtleme işleminin tam bir standardı olmadığından kayısındaki SO₂ miktarı da ayarlanamamaktadır (25). Kayısı kükürtlenmesinde kükürt yakma yerine alternatif kükürtleme yöntemi olarak; direk SO₂ gazı kullanımı ve sodyum metabisülfid solüsyonuna bandırma işlemi ile de kükürtleme yapılabileceğinin bildirilmesi ile Malatya'da Meyvecilik Araştırma Enstitüsü kurulmuştur. Kurum bünyesinde ve üretici düzeyinde kükürtleme işleminin standardisasyonu ve alternatif yöntemler için çalışmalar devam etmektedir (26,45).

SO₂, antimikrobiyal, antioksidan ve enzimatik olmayan esmerleşmenin önlenmesi, renk ağartma gibi nedenlerle yalnızca kayısı değil birçok besinde de vazgeçilmez bir gıda katkı maddesidir.

Kayısı için vazgeçilmez koruyucu madde olmasının nedenleri;

Ucuz ve kolay elde edilir,

Uygulaması kolaydır,

Kayısı kuruma süresinin kısaltır,

Kayısının doğal renginin korunmasını sağlar,

Raf ömrünün uzatılmasını sağlar,

Antioksidan özelliği vardır,

Muhafaza süresini artırır,

Fumigant özelliği nedeniyle kayısıda böceklenmeyi önler (57).

2.5. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD)

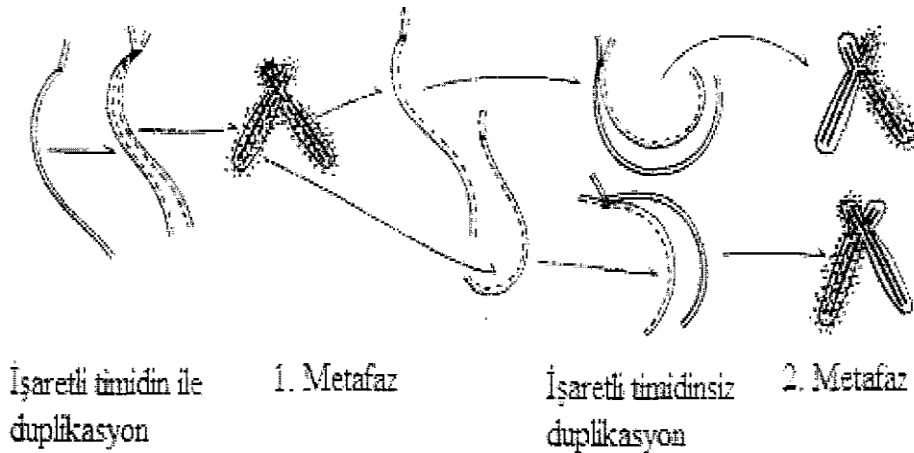
Kromatid değişimi (KKD), genotoksik ajanların *in vivo* ve *in vitro* koşullar altında DNA'da meydana getirdiği hasarı kromozom düzeyinde belirlemeyi sağlayan yöntemlerden birisidir (58). Kardeş kromatidler, bölünmekte olan hücrelerde, interfaz safhasında, DNA replikasyonu sonucu iki katına çıkan genetik materyalin sentromer bölgeleri ile birbirlerine tutunarak oluşturdukları, genetik olarak eş olan kromatidlerdir (59). KKD' nin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak DNA'daki her kromatide aynı bölgede kırıkların oluşabileceği, DNA zincirinde değişimin olabileceği ve oluşan bu kırıkların tamir edilebileceği bildirilmiştir. Bu süreç hücre siklusunun S fazında meydana gelmektedir. Fiziksel ve kimyasal etkenler ise KKD sıklığını arttırmaktadır (60).

KKD mutasyon oranı bir çok mutajen ve karsinojenlerin genotoksik etkisinin belirlenmesinde kullanılan basit ve duyarlı bir yöntemdir (58,61,62). DNA'da meydana gelen her hasar KKD' ye neden olmamaktadır, genellikle DNA ile kovalent bağlantılar yapan veya DNA tamiri mekanizmalarını etkileyen maddeler KKD'yi arttıran etkenlerdir. KKD, kimyasal ajanların genotoksitesini belirlemek amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem hem laboratuvar hayvanlarında hem de insan popülasyonlarında çalışılabilir (63). KKD'nin Bloom sendromu ve Xeroderma pigmentosum gibi kromozom instabilitesi sendromlarında sayısının artması tanımlayıcı olarak kullanılmasını sağlar (61). Ayrıca bazı kanser

hastalarının lenfositlerindeki spontan KKD oranının sağlıklı insanlara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (62).

2.5.1. Kardeş Kromatid Değişimi Analiz Yöntemleri

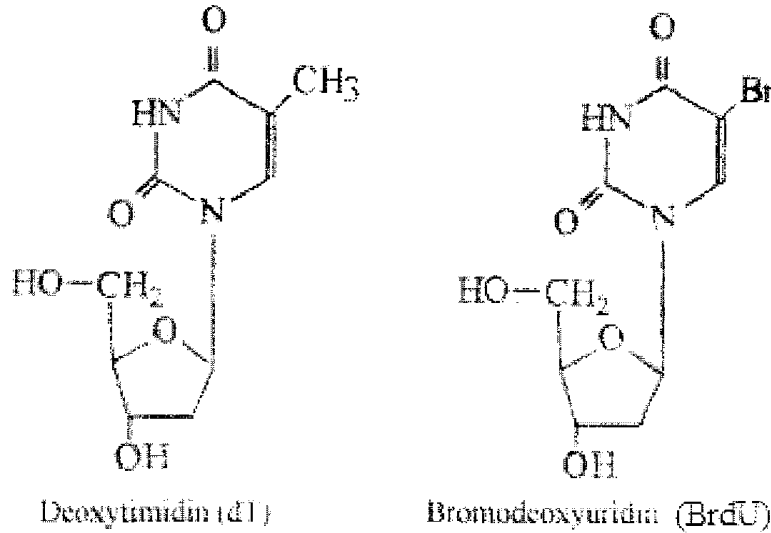
Kardeş kromatid değişimi alanında ilk çalışan araştırmacı Taylor ve arkadaşları olmuştur (64). Taylor ve arkadaşları, 1957 yılında, bitki mitotik kromozomlarında yaptığı otoradyografik çalışmalarda KKD'yi gözlemlemişlerdir. Bitki hücrelerine ait kromozomların radyoaktif timidin (3H-deoksi-Timidin) varlığında birinci mitozda replikasyonuna izin verilmiş, ikinci replikasyon ise izotopsuz ortamda gerçekleştirilmiştir (Şekil 2.2). DNA'nın semikonservatif replikasyonuna bağlı olarak otoradyografik yöntemle her kromozomun bir kromatidi işaretlenerek, kromozomların uzunlukları boyunca radyoaktif işaretlerin yer değiştirdikleri gözlenmiş ve bu değişimler Taylor ve arkadaşları tarafından kardeş kromatid değişimi olarak adlandırılmıştır (64).



Şekil 2. 2. Taylor ve arkadaşlarına göre radyoaktif timidin varlığında DNA replikasyonu (64).

Taylor ve arkadaşlarından sonra 1972 yılında Zakharov ve Egolina, Çin Hamster hücre kültürlerine, timidin analogu olan 5-Bromo-2 deoxyuridine (BrdU) ilave etmişler ve elde ettikleri preparatları giemsa ile boyayarak kardeş kromatidlerin

farklı boyandığını göstermişlerdir (Şekil 2. 3). BrdU' nun yeni sentez edilen DNA'ya girmesi, ilk S fazı sırasında olmaktadır. Replikasyon sırasında timidin yerine BrdU'yu alan zincir parlak boyanırken, diğer kardeş kromatid daha koyu boyanmaktadır (65).



Şekil 2.3. Deoxytimidi ve Bromodeoxyuridin'in halkasal yapıları (66).

Latt isimindeki araştırmacı ise 1973 yılında, kültür ortamına BrdU eklemiş ve floresan boya bisbenzamid (Hoechst 33258) ile kromatidlerin farklı boyandığını göstererek, bisbenzamid boyasının floresansı azalttığını rapor etmiştir. Hoechst 33258 boyası normalde deoksi adenin-deoksi timin baz çiftine (dA-dT) bağlandığında şiddetli floresan verirken, dA-BrdU ile bağlandığında boyanın floresanı söner. Böylece iki tane BrdU zincir içeren kromatid açık renk, biri timin ve diğeri BrdU içeren kromatid koyu renk olarak gözlenir (65).

1974'te DNA'nın yapısına giren BrdU' nun, Giemsa boyasının kromatinlere olan etkisini azalttığı Peny ve Wolff tarafından öne sürülmüştür. Bu bilgiler doğrultusunda Floresans Plus Giemsa (FPG) yöntemi geliştirilmiştir (65). İnsan kromozomundaki KKD bölgeleri, G bandı alan ve almayan bölge sınırında veya G bandı almayan bölgelerde yer almaktadır. KKD dağılımı kromozom gruplarında farklılık göstermektedir A, B, C ve D grubu kromozomlarındaki KKD dağılımı E, F, G grubu kromozomlarından daha fazladır. Kromozomlardaki bu dağılım rastgele

olup nedeni bilinmemektedir. En az KKD, G grubu kromozomlarında gözlenmektedir. KKD' nun kromozom uzunluğu ile arttığı da belirtilmektedir (67).

2.5.2. Kardeş Kromatid Değişimi Yöntemini Etkileyen Faktörler

Temel olarak iki bölümde incelenir (68).

1. Kültür Koşulları İle İlgili Faktörler: *İn vitro* koşullarda lenfositlerin büyümesi ve çoğalmasıyla olan kültür faktörleridir ve bu faktörlerin kontrol altına alınması mümkün olmaktadır (69).

a. Besiyeri: Farklı besiyerlerinde üretilen insan lenfositlerinde farklı KKD sıklığı gözlenmiştir (69).

b. Mitoz Uyarıcı: *İn vitro* koşullarda mitotik ajanlar kullanılarak mitoz artırılabilir. TPP (tüberkülin pürifiye protein), konkanavalin A, PWM (Pokeweed mitojen) ve PHA (Fitohemaglutinin) günümüzde kullanılan mitotik ajanlar olup en çok kullanılan PHA'dır (68).

c. Serum: Besiyerine eklenen serumun konsantrasyonu KKD oluşumunu etkiler (69).

d. BrdU: Konsantrasyonu: Kendisi de bir KKD indükleyicisi olan BrdU memeli kromozomlarında kromozom kırıklarına ve yeniden düzenlenmelerine yol açar. Yüksek dozda hücre kültürüne eklendiği takdirde, mitotik indekste azalmalara ve KKD frekansında artışlara neden olmaktadır. Bu nedenle kullanılacak BrdU dozunun minimum olması önerilmiştir. BrdU konsantrasyonu %10 arttırıldığında KKD frekansının %50 kadar arttığı gösterilmiştir (70).

e. Kültür Ortamının Sıcaklığı: Kültür ortamı için en uygun ısı 37 °C'dir. 36-38°C aralığına kadar tolerans görülürken 39 °C'nin üstündeki ısılarda kültürdeki hücreler ölür. Sıcaklığın geçici düşmesi hücreleri öldürmez fakat kültürleri yavaşlatarak harvest zamanında yeterli mitotik indeks eldesini engeller ve preperatların kalitesini düşürür (69, 71).

f. Karanlık Ortam: Kùltür süresince hücrelerin florasan ışığa maruz kalmaları BrdU içeren DNA'nın fotoliz olmasına bunun sonucunda hareketli alkali grupların oluşumuna sebep olur. Guanin ile reaksiyona girerek DNA'nın depurine olmasına yol açan bu oluşum, tek sarmalda kırılmalara neden olur ve KKD oluşumunu indükler. Bu nedenle de KKD analizi için kullanılacak kùltürlerin ışıktan korunması gerekmektedir (68).

g. Kolçisin Konsantrasyonu: Mitotik mekik inhibitörü olan Kolçisin, kromozomların metafaz evresinde kalmalarını sağlar. Kolçisinle muamele süresi ile metafaz indeksinin sayısı birbiri ile orantılıdır. Ancak uzun süreli maruziyet kromozom boylarında kısalmaya neden olur. Bu nedenle süre iyi ayarlanmalıdır (72).

h. Hipotonik Çözelti: Hipotonik çözeltilerdeki tuz yoğunluğunun sitoplazmik tuz yoğunluğundan daha düşük olması çözelti içerisindeki suyun hücre zarını aşp hücreye girmesini ve hücreleri şişirerek eritrositlerin patlatılmasını sağlar. Hipotonik ile muamele süresi kritik bir öneme sahiptir. KCI, kromozomlarda en az hasara neden olduğu için en çok tercih edilen hipotonik çözeltilisidir (72).

ı. Fiksasyon: Fiksasyon amacı ile taze hazırlanmış 3:1 oranında alkol ve glacial asetik asit kullanılır. Bu oranın değişmesi kromozom morfolojisini olumsuz yönde etkiler. Asetik asitin bu orandan yüksek olması erken hücre zarı yırtılmasına yol açarak kromozom kayıplarına neden olur. İlk fiksasyon uygulaması esnasında kùltürü sürekli karıştırmak gerekir. İlk fiksasyonla ortamda geriye kalmış olan eritrositlerin hemoliz olması sağlanır. Fiksasyon uygulamasından sonra kırmızı renkli olan hemoglobin koyu kahve renkli hematine döner. Yeterli karışırma yapılmamışsa, koyu kahve renkli çökelti gözlenirken mitotik indeks düşer ve preparatların kalitesiz olmasına neden olur (72).

2. Biyolojik Faktörler: Bireylerin genotipleriyle birlikte, genel sağlık durumları veya yaşam tarzı ile ilgilidir (69).

a. Sigara Kullanımı: Sigara kullanımı KKD sıklığını büyük oranda etkilediği ve KKD'yi arttığı kanıtlanmıştır (73).

b. Cinsiyet: Cinsiyete göre KKD frekansının dişilerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 10-14 yaşlarında dişilerde görülen KKD frekansındaki fazlalığının o dönemde salgılanan hormonlardan kaynaklanabileceği bildirilmiş, kadınlarda ise KKD' nin mensturasyon sonunda maksimuma ulaştığı, ovulasyon süresince en aza indiği gözlenmiştir (68).

c. Yaş: Yaşın KKD değişimi üzerinde bir etkisi olmadığı şeklinde yapılan çalışmaların yanı sıra çocuklarda KKD sıklığının yetişkinlere göre daha az olduğunu gösteren çalışmalar da yapılmıştır (67,68).

d. Genetik Faktörler: Monozigotik ve dizigotik ikizlerde insanlar arasındaki farklılıkların genetik faktörlere bağlı olup olmadığını belirlemek amacıyla lenfosit kültürlerinde KKD düzeyleri araştırılmıştır. Pedersen ve arkadaşları yapılan bir çalışmada genetik faktörlerin KKD sıklığı ve kromozomlara dağılımı üzerine önemli bir etkisinin olmadığını göstermişlerdir (74).

e. İlaç Kullanımı: Pek çok ilaç KKD sıklığını tetiklemektedir (69).

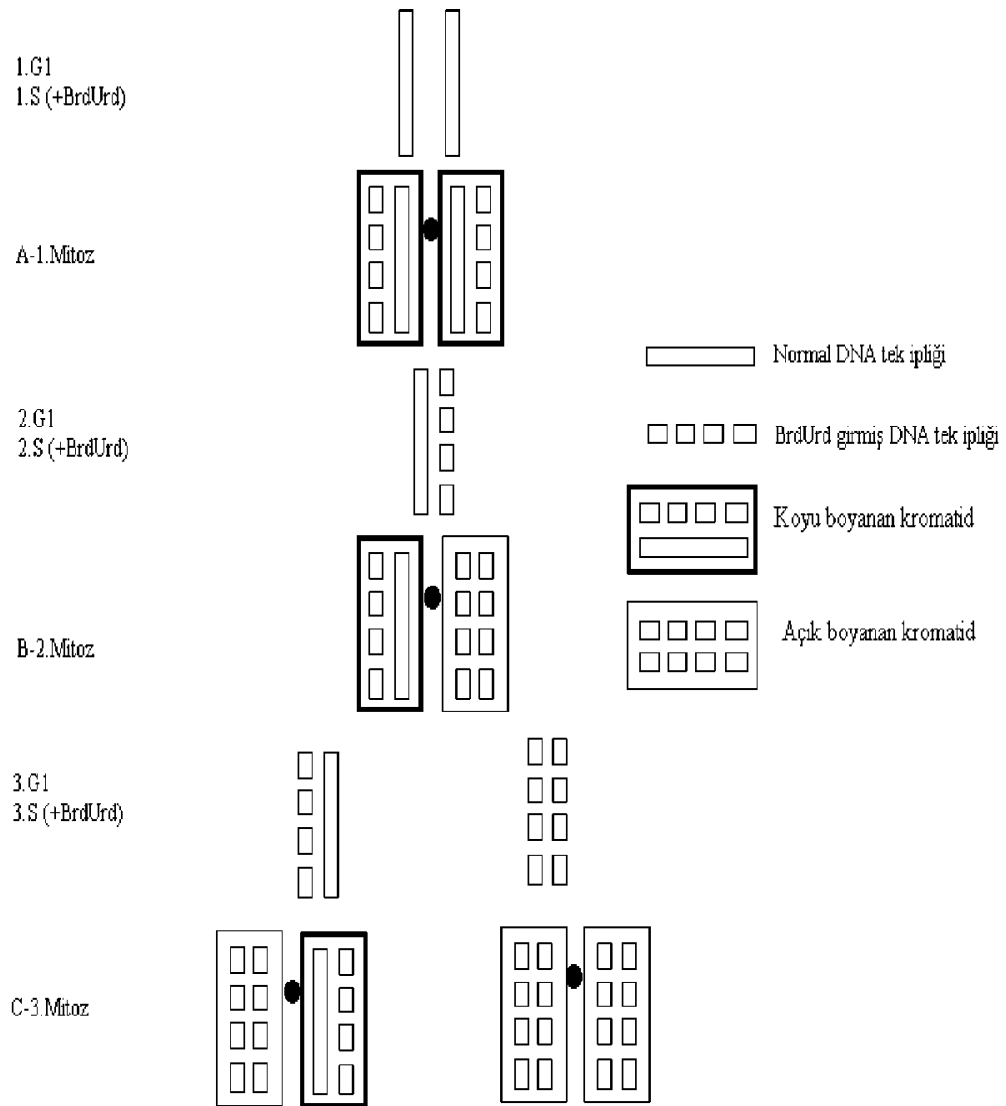
2.6. Replikasyon İndeksi (RI)

Replikasyon indeksi veya proliferasyon indeksi, metafaz hücreleri tarafından tamamlanan replikasyon sayısıdır. KKD preparatları kullanılarak yapılan RI hesaplamaları, bu esnada belirlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücrelerin sayısının hesaplanmasıyla belirlenir (75, 76).

Birinci, ikinci ve üçüncü metafaz plakları şu şekilde ayırt edilir: BrdU, deoxytimidin (dT) ve deoxyuridin (dU) birbirlerinin analogu olan bileşiklerdir. BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark taşıdıkları heterosiklik benzen halkasındaki

beşinci C atomuna bağlanan grupların farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Beşinci G atomuna bağlanan grup dT' de CH₃, BrdU' de Br ve dU'de H atomudur.

DNA'nın yapısında bulunan timin bazlarının analogu olan BrdU, kültür ortamına eklendiğinde hücrelerin DNA'larını replike ettikleri birinci S fazında yeni sentezlenen polinükleotid ipliğinde timin ile ortamda bulunan BrdU yer değiştirecektir. Kromozomları boyanan böyle hücrelerin bir kromozomun her iki kromatidi de (dT/BrdU:dT/BrdU) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.4A). Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden oluşan yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU' lu ortamda ikinci S fazı) timin içeren polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdU'lu iplikçik mevcut olacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdU) oluşturacaktır. BrdU içeren ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdU geçecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliğinde BrdU bulunacağından (BrdU/BrdU) bu kromatid, aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz evresinde kromozomlar boyandığında tüm kromozomların kromatidlerinden birisi koyu diğeri açık renkte boyanacaktır (dI/BrdU;BrdU/BrdU). Bunlarda ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.4B). Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde ikinci mitozda açık boyanan kromatidden tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom oluşacaktır ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık boyanacaktır (BrdU/BrdU: BrdU/BrdU). İkinci mitozda koyu boyanan kromatidden ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdU'lu ve diğerkromatidinin bir ipliği BrdU'lu diğeri ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozomunda boyanması ile bir kromatidi koyu renkte, diğerkromatidi açık renkte olacaktır (dI7BrdU:BrdU/BrdU). Hücrenin metafaz devresinde preparatı yapılan bu hücre kromozomlarının her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların ise bir kromatidi açık diğerkromatidi koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir (Şekil 2.4C) (66, 77).



Şekil 2.4. BrdU' nun DNA yapısına girmesi ile 1. 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (66).

2.7. Kromozom Aberasyonları (KA)

Kromozom aberasyonları, hücre bölünmesi sırasında spontan olarak veya indüklenerek oluşan hatalar sonucu meydana gelebilmektedir. Kromozom aberasyonlarının mutajen ve karsinojen ajanlar tarafından indüklenbildiği ve aberasyon frekansının kanser riski taşıyan grupların tespit edilmesinde önemli olduğu belirlenmiştir (78). Bu metotla kromozomlar sayısal ve yapısal anomali

açısından değerlendirilmektedir. Aşağıda belirtilen şekilde kromozomal aberasyonlar gözlenmiştir (66).

1) Kromozom Kırığı: Bir kromozomun her iki kromatidinde aynı noktada oluşan kırılma sonucu hücrelerin her ikisi de defisiyensli kromozom bulundurur (79).

2) Kromatid Kırığı: Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde kırılma sonucu oluşmaktadır (66).

3) Fragment: Kopmuş olan kromozom parçalarıdır ve metafaz plağında kopmuş olduğu kromozomdan ayrı yerlerde bulunurlar (66).

4) Disentrik Kromozom: İki kromozomda, uç kısmından kromozom kırığı tipinde bir kırılma ile sentrik fragmentlerin kopuk olan uçlarının birbirleriyle birleşmesi sonucu meydana gelir (66).

5) İzokromozom: Kromozomal bir kopma sonucu primer boğumda meydana gelen, kardeş kromatidlerin birleşmesiyle oluşan ve kromozom kollarının her ikisinin de birbiriyle aynı olduğu kromozomlardır (80).

6) Kromatid Değişimi: Iriradyal(üçlü) quadriradyal (dörtlü) şekillerde büyük ve küçük submetasentrik kromozom kollarının yan yana gelmesiyle ve kromatidlerin birbiriyle değişmesiyle oluşur (66).

7) Kardeş Kromatidlerin Birleşmesi: Kromozomda meydana gelen kırık sonucu iki hasarlı kardeş kromatidlerin kırık olan uçlarının birleşmesidir. Mitozun anafazında bu kromatidler zıt kutuplara çekilirken kromozom köprüsü oluştururlar (66).

8) Translokasyon: Kromozomal bir kopma sonucu, kopuk olan bir uca homolog olmayan kromozomlardan başka bir kopuk parçanın yapışmasıdır. Kromozom parçası yer değişimleri, tek taraflı veya karşılıklı (resiprokal) olabilir (80).

9) İnverson: Bir kromozomun içinden kopan parçanın 180° ters dönerek tekrar aynı yere yapışmasıdır. İnverson sonucunda kromozomdaki genlerin diziliş sırasında değişme meydana gelir (81).

10) Halka kromozomu: Bir kromozomun iki ucunda da meydana gelen kromozomal kopma sonucu oluşan kırık uçların birleşmesi ile meydana gelen kromozomlardır (81).

11) Endoreduplikasyon: Bazı durumlarda bölünmeyen hücrelerin DNA'sı tekrar replike olur ve bunun sonucunda önceki kromozomun her bir kromatidinden iki kromatidli birer kromozom meydana gelir. Birbirinden ayrılmayıp bir arada kalan kromozomlar metafaz plağında iki kromozom ve dört kromatitden oluşmuş olarak görülen yapılar oluşturur. Bu yapılara endoreduplikasyon adı verilir (82).

12) Poliploidi: Bir hücrenin ikiden fazla kromozom takımı bulundurmasıdır (82).

Kromozom aberasyonları bantlama, floresans, otoradyografi ve FISH gibi metotlarla belirlenebilmektedir (82).

2.8. Mitotik İndeks (MI)

İncelenen toplam hücre içerisinde mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin toplam hücreye yüzde cinsinden oranına mitotik indeks denir. MI, hücre kültürüne ilave edilen test maddesinin, hücre bölünmesi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla kullanılır (66).

2.9. Mikronükleus (MN)

Mikronükleus (MN) genotoksisite ve kanserojenitenin belirlenmesinde kullanılan sitogenetik yöntemlerden biridir (11). MN yöntemi ilk kez 1976 yılında, X ışınlarının neden olduğu genotoksisiteyi araştırmak için Countryman ve Heddle tarafından ileri sürülmüştür (83). Daha sonra Fenech ve Moiley adı verilen

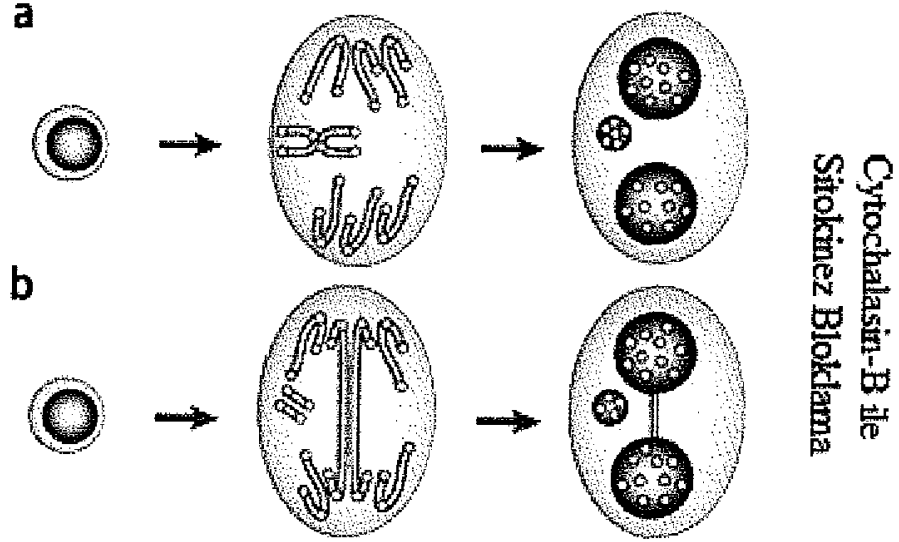
araştırmacılar tarafından sitokinez-bloklama MN metodunun geliştirilmesiyle, nükleus bölünmesini tamamlamış hücrelerdeki MN'lar incelenmeye başlanmıştır (84). MN, hücre sitoplazması içinde ana nükleusdan ayrı, onunla aynı şekil, yapı ve boyanma özelliği gösteren küçük küresel bir yapıdır. Bu yapılar anafaz evresinde geri kalan kromozomlar, asentrik kromozom fragmentleri veya yavru nükleusa girmeyen kromozomların yoğunlaşmasıyla oluşmaktadır. Bu nedenle MN, kromozomal fragment veya tüm bir kromozom içerebilmektedir (85,86).

MN içeren hücrelerin diğer hücrelerden ayrılmasında güçlükler yaşanması ve genetik hasar hakkında net bilgiler verilememesi nedeniyle "Sitokinez-Blok" MN (Cytokinesis-Block Micronucleus Technique; CBMN) tekniği geliştirilmiştir (87). Bu metot, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan Cytochalasin-B (Cyt-B) ile bir nükleer bölünmeyi tamamlayan hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanmaktadır. Cyt-B, sitokinez sırasında kardeş nükleuslar arasındaki sitoplazmayı daraltan mikrofilament halkanın oluşması için gerekli olan aktin polimerizasyonun bir inhibitörüdür. Standart lenfosit kültürlerine uygun konsantrasyonda Cyt-B ilavesiyle, çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş çift çekirdekli hücreler kolaylıkla tanınarak sayılabilmekte ve MN bulunduran hücrelerin oranı saptanabilmektedir (Şekil 2,5) (10). Kültüre edilen insan lenfositleri için geliştirilmiş olan bu yöntem günümüzde solid tümör ve kemik iliği hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerine de uygulanabilmektedir (88).

MN testi sitogenetik hasarın belirlenmesinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilen, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesini sağlayan geniş bir alanda kullanılması mümkün olan bir testtir (10). MN yöntemi ile hem klastojenik hem de anöjenik etkiler belirlenebilmektedir. Bonassi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmalarda periferik kan lenfositlerindeki MN frekansının yüksek olması insanlarda kanser riski gösterdiğini belirtmişlerdir. Fenech ve arkadaşlarının, uluslararası işbirliği ile yaptıkları insan mikronükleus projesindeki bulguları, MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça desteklemiştir (88).

MN oluşumunda, mitoz sırasındaki mitotik iğ ipliklerindeki hatadan veya anafazdaki kompleks konfigürasyonlardan kaynaklı bütün bir kromozomun kaybı,

mitotik asentrik fragmentlerin kaybı, kromozomal kırık ve değişimlerin mekanik sonuçlarındaki çeşitlilik ve apoptozis olmak üzere dört çeşit mekanizma vardır (87).



Şekil 2.5 Mikronükleus oluşumu a) Anafazda geri kalan kromozomların oluşturduğu MN b) Asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan MN ve sentromerleri ile hücrenin karşı kutuplarına çekilen disentrik kromozomlardan nükleoplazmik köprü oluşumu (88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 25–30 yaşlarında, sigara içmeyen, kronik, metabolik ve genetik hastalığı olmayan sağlıklı dört erkek donörden 5'er ml periferik kan örneği alınmış ve tam kan hücre kültürü yapılmıştır. Kültür ortamına değişik dozda kükürt dioksit uygulanarak olası genotoksik etkileri araştırılmıştır.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Deney Ekipmanları

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.1.1.1. Kükürt Dioksit

Açık Formülü:



Bilinen adları: Kükürtlü anhidrit, Kükürt (IV) oksit

Kapalı Formülü: SO₂

Molekül ağırlığı: 64.06 g mol⁻¹

Safılığı: %99

3.1.1.2. Siklofosfamid (Cyclophosphamide)

Siklofosfamid bu çalışmada pozitif kontrol olarak kullanıldı. Steril saf suda hazırlanarak + 4°C' de saklandı. Kültür tüplerine 160 ng/ml'lik dozda ilave edildi.

3.1.1.3. Kromozom Medyumu

Bu çalışmada Peripheral Blood Karyotyping Complete Medium (Bio İnd, 01-201-İB), hücre kültürü için kullanıldı. Bu medyum steril olan kültür tüplerine, her tüpte 5 ml olacak şekilde paylaştırılarak kullanıldı.

3.1.1.4. Kolşisin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik iplik inhibitörü olarak kolşisin (Sigma, G9754) kullanıldı.

3.1.1.5. Hipotonik

Hipotonik olarak 0,056 M'lık KCl kullanıldı. Her preparasyondan yaklaşık 2 saat önce taze olarak hazırlanıp kullanım amacına göre 37 °C' deki inkübatörde ya da +4 °C' de bekletildi.

3.1.1.6. Fiksatif

KKD ve KA için kullanılan fiksatif, 1 kısım glasiyal asetik asitin 3 kısım metanol ile karıştırılması sonucu hazırlandı. MN için ise farklı iki şekilde fiksatif hazırlandı. İlk fiksatif 1 kısım glasiyal asetik asitin 5 kısım metanol ile karıştırıldıktan sonra 1/1 oranında %0,9 NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlanırken diğer fiksatif ise NaCl eklenmeden hazırlandı. Fiksatif, her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce hazırlanıp +4°C' de saklandı.

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

BrdU (sigma, B 5002) eriyiği steril distile su içerisinde hazırlandı, daha sonra 0,2 ml çapındaki membran filtre ile steril edildi. Bu eriyikten KKD kültür tüpleri içerisindeki kromozom medyumuna son konsantrasyon 10 µg/ml olacak şekilde eklendi.

3.1.1.8. Sorenson Tamponu

KKD preparatları, preparat yapımı esnasında Sorenson tampon içerisine konularak UV lambası ile ışınlandırıldı. Aynı zamanda %5'lik Giemsa boyası hazırlanmasında da bu tampon kullanıldı. Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlandı ve bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle farklı miktarlarda karıştırılarak kullanıldı.

Hazırlanışı:

Tampon A: 11,34 gr KH_2PO_4 250 ml saf su içinde eritildi (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 eritildi (pH=9,3).

3.1.1.9. SSC (Standart Saline Sitrat) Eriyiği

Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak için kullanıldı. SSC eriyiği; 11,05 gr trisodyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 21, 9 gr NaCl kullanılarak hazırlandı. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözüldü, daha sonra aynı kaba aktarılarak birbirleriyle karıştırılıp, üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edildi. Hazırladığımız bu stok eriyik 5xSSC buzdolabında saklandı. Çalışmamızda bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1 x SSC kullanıldı.

3.1.1.10. PBS (Phosphate Buffered Saline)

KA preparatlarının boyanması sırasında tripsinin etkisini nötralize etmek amacıyla kullanıldı.

Hazırlanışı:

8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 0,92 gr Na_2HPO_4 ve 0,2 gr KH_2PO_4 1 lt distile su içinde eritilerek stok halinde hazırlandı.

3.1.1.11. Giemsa

Giemsa boyası (Merck, 9204) distile su içinde %5'lik boya eriyiği olarak hazırlandı ve preparatların boyanmasında kullanıldı.

3.1.1.12. Entellan

Preparatlar daimi hale getirilirken lam ve lamelin birbirlerine yapıştırılmasında kullanılan (Merck, 7961) preparat kapatma solüsyonudur.

3.1.1.13. Cytochalasin B

Cytochalasin B (Serva, 18015) MN testinde, hücre bölünmesi sırasında sitokinezi engellemek ve iki nükleuslu hücreler oluşturmak amacıyla kullanıldı. Kültür tüplerinde 6 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde hazırlandı.

3.1.1.14. Tripsin

KA preparatların boyanması sırasında kullanılan tripsin solüsyonu histon dışı ve kromozomal proteinlerin denatüre edilmesi ve kromozomların daha net görünmesini sağlamak amacıyla kullanıldı. %0,12'lik eriyik halinde hazırlandı.

3.1.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.1.2.1. Analytik Jena Multi EA UV Dedektörü Kükürt Tayin Cihazı

Besi yerinde kükürt dioksit miktarını ölçmek için kükürt tayin cihazı (Analyzer multi EA3100; Win 4.05) kullanıldı.

3.1.2.2. Hassas Terazi

0,001 gr hasasiyetindeki terazi (Precisa) kimyasalların tartılmasında kullanıldı.

3.1.2.3. Santrifüj

Rotor çapı 21cm olan ve 4000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 99dk'lık zaman ayarlayıcı ve 28 tüp kapasiteli santrifüj (Hettich Universal) çalışmalarda kullanıldı.

3.1.2.4. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan binoküler ışık mikroskobu (Olympus) preparat incelemeleri sırasında kullanıldı.

3.1.2.5. İnkübatör

Hücrelerin 37°C' de inkübe edilmesi için inkübatör (Nüve EN500) kullanıldı.

3.1.2.6. Flow Kabin (Steril Kabin)

Hücre kültürü tüplerine kan ekiminin yapılması, test solüsyonlarının hazırlanması ve kültür tüplerine ilave edilmesi sırasında steril bir ortam olarak, % 99,9 partikül tutma özellikli filtreye sahip, UV ve floresan ışığı olan flow kabin (Labormed) kullanıldı.

3.1.2.7. Su Banyosu

Hücre kültürü preparatları hazırlandıktan sonra, kardeş kromatidlerin farklı boyanmasında kullanılan SSC eriyiğinin 58-60°C' de sabit kalmasını sağlamak amacıyla 0-60 °C'ye ayarlanabilir su banyosu (Memmert) kullanıldı.

3.1.2.8. pH Metre

Kimyasalların pH değerlerini saptamak için pH metre (Hanna Phep) kullanıldı.

3.1.2.9. Vorteks

Vorteks harvest işleminde hipotonik ve fiksatif aşamasında kullanıldı.

3.2. Çalışma Planı

Çalışmamızda, herhangi bir kimyasal madde uygulanmayan negatif bir kontrol grubu, Siklofosfamid'in (160 ng/ml) kullanıldığı pozitif bir kontrol grubu ve değişik dozlarda SO₂'nin kullanıldığı üç deney grubunun 72 saatlik uygulamaları yapıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışma Planı

Genotoksisite Parametreleri	Gruplar	Süre (saat)
KKD	Negatif Kontrol	72
KA	Pozitif Kontrol (Siklofosfamid: 160(ng/ml))	72
MN	Kükürt dioksit	
MI	- 1,00 ppm	72
RI	- 0,50 ppm	72
	- 0.05 ppm	72

3.3. SO₂ Uygulanması ve doz belirlenmesi

SO₂ uygulanması: % 99 saflıkta SO₂ içeren tüpten; minimal doz için 0.05 ppm, orta doz için 0.50 ppm ve maksimum doz için 1.00 ppm steril şartlarda deney grubundaki tüplere uygulandı. Yaptığımız literatür taramalarında deney modelimize uygun insan lenfosit hücrelerine *in vitro* şartlarda SO₂ uygulamasına rastlayamadığımız için deney öncesi *in vitro* letal doz belirleme çalışmaları yaptık. Bu ön çalışmada kültürdeki hücrelerin %100'ünü öldüren doz 1,50 ppm ve %50'sini öldüren doz 1,00 ppm olarak belirlendi. Bu verilerden yola çıkarak maksimum doz LD50'ye denk gelen 1,00 ppm olarak uygulanırken diğer dozlar ise bu değerin katları şeklinde azalan değerlerde belirlendi.

3.4. Kültür işlemleri

Çalışmamızda *in vitro* lenfosit kültürlerine minimum, orta ve maksimum olmak üzere üç farklı doz uygulandı. Kültürdeki memeli hücrelerinin hücre siklusu yaklaşık 24 saat olduğu için, ikinci ve üçüncü mitozların gözlenebilmesini sağlamak amacıyla KKD ve KA testleri için inkübasyon süresi 72 saat, MN testi için ise 68 saat olarak belirlendi. Belirlenen konsantrasyonlarda insan lenfosit kültürleri yapıldı. Besi yerlerinin periferik kan ekiminden önce ve kültürden 72 saat sonra olmak üzere iki kez Analytik Jena Multi EA UV Dedektörü Kükürt Tayin Cihazında kükürt dioksit miktarı ölçümleri yapıldı.

3.5. Besi Yerlerinde Kükürt Dioksit Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Sıvılar için kükürt tayin cihazının kullanımı;

Besi yerinde SO₂ miktarını ölçmek için kükürt tayin cihazı (Jena Multi Analyzer EA3100; Win 4.05) kullanıldı. Numunenin sıvı kısmından alınan 2 ml'lik örnek biay adı verilen cam tüplere transfer edildi. Tüpler otomatik samplere yerleştirildi ve cihaz bilgisayardan açıldı. Cihaz fırınının 1050°C' ye gelmesi beklendi. Argon ve Oksijen gazlarının cihazdan geçişi dakikada 200 ml olacak şekilde gaz tüpleri açıldı. Cihazın 1050°C sıcaklığa ulaşmasıyla samplere

yerleştirilen örnek numuneden cihaz tarafından otomatik olarak 10 µl çekilir. Numuneden 10 µl alınmadan önce şırınga üç kere numuneden çekti ve atık kabına boşalttı. Daha sonra üç kere pompa yaptı ardından hava boşluğu kalmayacak şekilde 10 µl sıvı çekti. Bu sıvıyı yatay tüpe bağlı olan quartz bota boşalttı ve içinde örnek bulunan quartz bot yavaş yavaş fırına gönderildi. Ani alevlenmelere karşı bir alev sensörü olduğu için numunenin fırına gönderilmesi oldukça kontrollü olarak yapıldı. Numunenin fırına ulaşmasıyla ilk yanma gerçekleşti ve yanan numunenin içerdiği kükürt ortamdaki oksijen ile birleşerek SO₂ 'e dönüştü. Oluşan SO₂ UV dedektörü tarafından okundu. SO₂ okunduğu anda bilgisayar ekranında, SO₂ miktarının yükselmesine bağlı olarak alanı geniş bir pik oluştu. Daha sonra cihaz, sürükleyici gaz olarak kullanılan argon gazını keserek yerine O₂ gazı geçirmeye başladı ve böylece ikinci yanma gerçekleşti. Bu kez bilgisayar ekranında ilkinde göre daha küçük bir pik alanının oluştuğu gözlemlendi.

Her bir numune için en az iki en çok üç tekrarlı sistem uygun görüldü. Birbiri ile tutarlı olan ve aralarındaki farkın %3 kadar olduğu iki değer ortalama bir değer olarak kabul edildi. Sapmış olan değer (diğerinden uzak olan değer) ortalamaya dâhil edilmedi. Pig alanından yola çıkılarak SO₂ miktarı hesaplandı var olan SO₂ ile kükürt arasında birebir kütle ilişkisi olması nedeniyle SO₂→S dönüşümü yapıldı ve numunedeki kükürt miktarı g/kg cinsinden belirlendi. Her bir değer 3 ölçümden oluştuğu için işlem ortalama 45 dk devam etti. Normalde numuneden 20 µl alınarak yapılır ancak hacmi 10 µl' ye düşürmemizin nedeni kalibrasyon aralığında kükürt ölçülebilmesidir.

Kullanılan oksijenin kalitesi oldukça önemlidir. Bu cihazda kullanılan oksijen, Avrupa oksijen saflık derecesindedir. Saflık derecesi sonuçların kül bırakmaması ve net sonuçların elde edilmesi için gereklidir.

Kullanılan bu cihaz kükürt bakımından akredite bir cihaz olup güvenilirliği dünya çapında kanıtlanmıştır.

3. 6. Kardeş Kromatid Değişimini ve Kromozom Aberasyonlarını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

3. 6. 1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen 25-30 yaşlarında gönüllü dört erkek donörden alınan 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,4 ml kan örnekleri 5'er ml'lik kromozom medyumlarına steril şartlarda ekildi. Ekim sırasında, KA çalışılacak tüplere herhangi bir kimyasal madde uygulaması yapılmazken KKD çalışılacak kültür tüplerinin her birine daha önce hazırladığımız BrdU eriyiğinden her tüpe son konsantrasyon 10 u.g/ml olacak şekilde ilave edilerek iyice karıştırıldı ve hücre kültürü inkübatörde 37 °C' de 72 saat için inkübasyona bırakıldı (89).

SO₂ etkisini incelemek için kültür sırasında maksimum, orta ve minimum dozlar kültür tüplerine ilave edildi. 72 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak Siklofosfamid kullanıldı. Siklofosfamid tüplere 160 ng/ml olacak şekilde verildi. 72 saatlik kültür sonunda KKD ve KA için aynı hasat işlemleri uygulanarak preparatlar boyanmaya hazır hale getirildi. Kültür süresinin bitiminden 1 saat önce (kültürün 71. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edildi (0,04 ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırıldı. Hücreler 1 saat süresince 37°C'de kolşisin ile muamele edildi. 72. saatin sonunda kültür tüpleri 1600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, 37°C'de etüvde bekletilen hipotonik eriyiğinden 8 ml olacak şekilde damla damla ve vorteks ile karıştırılarak ilave edildi. Daha sonra tüplerin ağzı kapatılarak 20 dk oda ısısında bekletildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1600 rpm'de santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Hipotonikte olduğu gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 6 ml soğuk fiksatif ilave edildi. Hücreler 1600 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı. Son fiksatif muamelesinin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görüldü. Eğer sıvı berraklaşmamışsa tekrar fiksatif muamelesine devam etmek gerekir. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atıldı. Son santrifüjden sonra

dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçildi. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekildi. Pasteur pipetinden, daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanmış lamaların üzerine 50-75 cm yükseklikten farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla, kromozomların lam üzerinde yayılması sağlandı. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması sırasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edildi. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi (89).

3.6.2. KKD Preparatlarının Boyanması

Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtülecek şekilde Sorensen tamponu ile kapatıldı. 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınarak hazırlanan ışınlama eriyiği, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (pH=6,8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkının önemli derecede etkilediği görüldü. Bu şekilde ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen ultraviyole lambası ile 30 dk ışınıldı. Işınlama bittikten sonra preparatlar 1xSSC eriyiği içerisinde 58-60°C arasındaki sıcaklıklarda 60 dk inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitmeden 15 dk önce %5'lik Giemsa boya eriyiği hazırlandı (65, 90).

% 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 tamamlandı (pH=6,8). Ardından boya dik bir şale içine filtre kâğıtları ile süzüldü. İnkübasyon süresinin sonunda preparatlar 1xSSC solüsyonundan alınarak direkt olarak boya içerisine konuldu ve yaklaşık olarak 25 dk boya içerisinde bekletildi (kardeş kromatidler arasındaki en iyi kontrast farkı bu sürede sağlanmıştır). Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette

konularak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlar da mikroskopik incelemeler yapıldı (66, 90).

3.6.3. KA Preparatlarının Boyanması

KA preparatlarının boyanmasında GTG (Giemsa-Tripsin-Giemsa) bantlama yöntemi kullanıldı. Bunun için, içinde sırasıyla tripsin (%0,12), PBS tamponu ve %5'lik giemsa boya solüsyonları bulunan üç şale hazırlandı. 24 saat oda ısısında bekletilmiş olan preparatlar 2-3 saniye tripsin ile muamele edildikten sonra tampondan geçirildi. Tripsinden geçirme preparatın yaşlanma süresi ile ilişkilidir. Uzun süre yaşlandırılan preparatların tripsin ile daha uzun süre temas ettirilmesi gerekebilir. Preparatlar tampondan geçirildikten sonra 5 dakika %5'lik giemsa boyasında bekletildi. Bu sürenin sonunda preparatlar boyadan çıkarıldı, üç ayrı kaptaki saf su içinden geçirilerek preparatlar üzerindeki fazla boyanın akması sağlandı. Bundan sonra preparatlar dik vaziyette konularak kurumaya bırakıldı. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirildi. Entellan kuruduktan sonra bu daimi preparatlar da mikroskopik incelemeler yapıldı.

3.6.4. Mikroskopik İnceleme

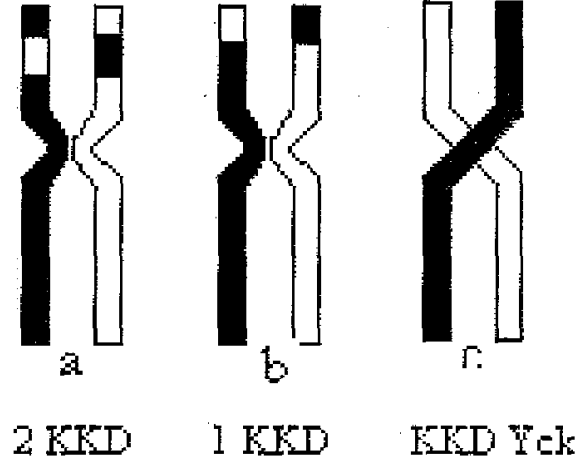
Hazırlanmış olan daimi preparatlar binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelendi.

3.6.4.1. KKD ve Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması

3.6.4.1.1. KKD Sayısının Saptanması

KKD sayısı, her bireyin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (4 kişiden toplam 100 hücrede) belirlendi. KKD sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla hesaplandı. Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki KKD olarak değerlendirildi, uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir KKD olarak sayıldı. Ancak bu incelemeler

esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir Bu durumdaki kromozomlarda KKD yoktur (Şekil 3 1) (66).



Şekil 3.1. Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (66).

3.6.4.1.2. Replikasyon İndeksi (RI)'nin Saptanması

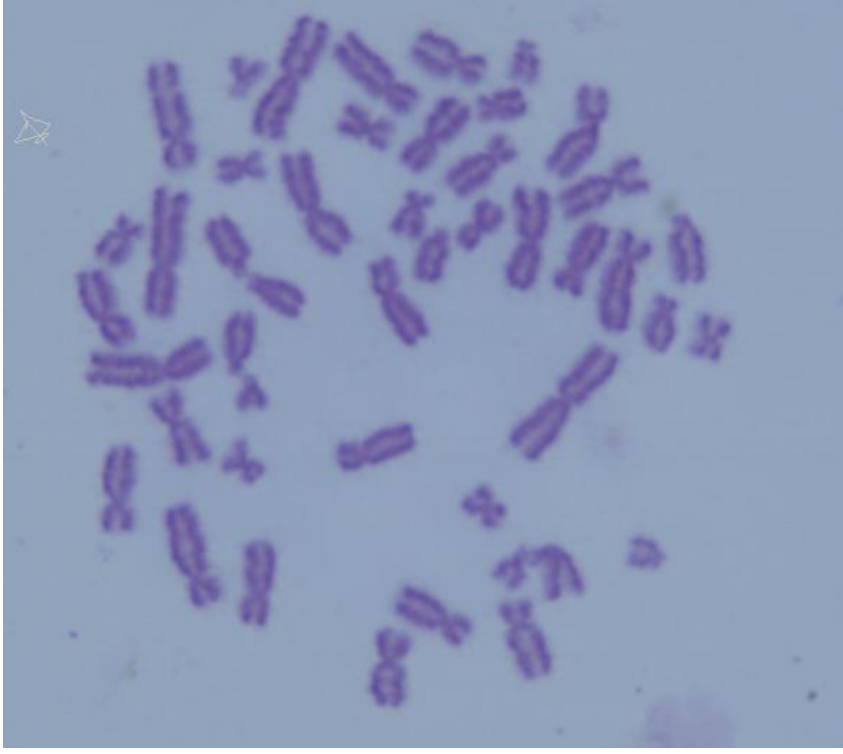
SO₂'in DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile RI hesaplandı. Bunun için KKD preparatlarında tesadüfi seçilmiş 100 hücre incelendi. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci (Şekil 3.2), ikinci (Şekil 3.3) ve üçüncü (Şekil 3.4) metafaz devresindeki hücrelerin sayısı saptandı. Bu verilerden yola çıkarak RI şu şekilde hesaplandı (76):

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

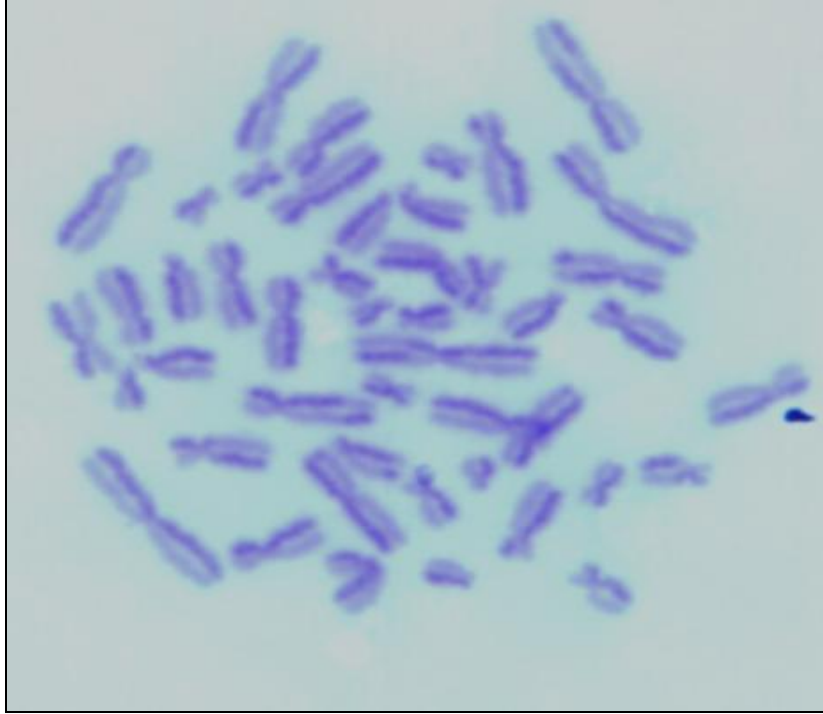
M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

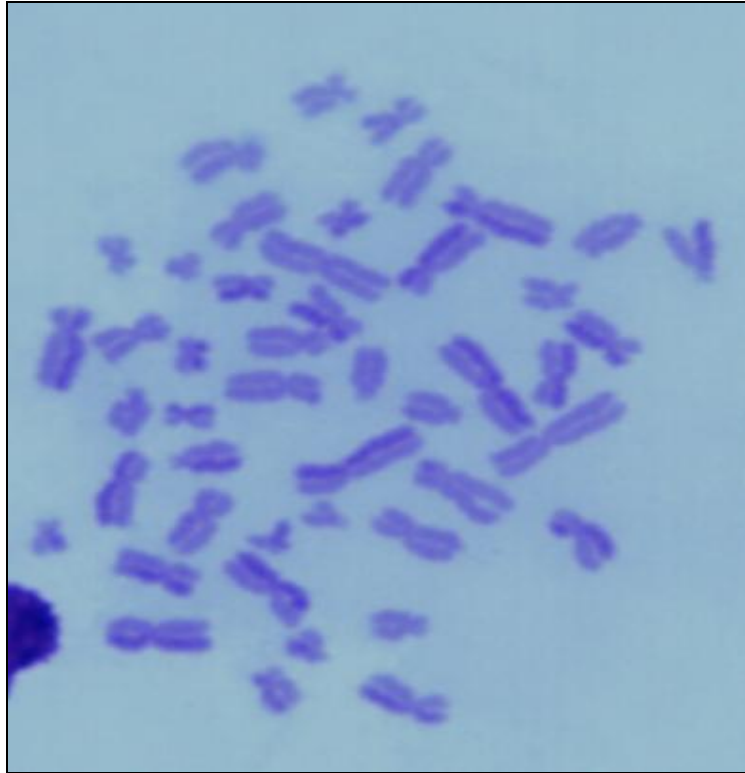
M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı



Şekil 3. 2. Birinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).



Şekil 3. 3. İkinci Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).



Şekil 3. 4. Üçüncü Mitoz Bölünmeyi Geçiren Hücrelerin Metafaz Kromozomları (x1000).

3.6.4.2. Kromozom Aberasyonlarının ve Mitotik İndeksin Saptanması

3.6.4.2.1. Kromozom Aberasyonlarının Saptanması

Dört donörden elde edilen KA preparatlarına ait iyi dağılmış kromozomlara sahip 100 metafaz alanı (4 kişiden toplam 400 metafaz) incelendi. İnceleme sırasında, bu hücrelerde gözlenen kromozomal ve kromatid tipi yapısal aberasyonlar ile sayısal kromozom düzensizlikleri kaydedildi. Saptanmış olan kromozom aberasyonlarından hücre başına düşen anomali belirlenerek, anormal hücre yüzdesi hesaplandı.

3.6.4.2.2. Mitotik İndeks (MI)'in Saptanması

SO₂'in mitoz bölünme üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile her bir bireye ait KA için hazırlanmış preparatlarda toplam üç bin hücre incelendi ve

bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedildi. 3000 hücre içinde mitoz geçiren hücrelerin oranı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak yüzde cinsinden MI belirlendi (66).

$$MI = \frac{\text{Metafazdaki hücre sayısı (M)} \times 100}{N}$$

N

N: Toplam hücre sayısı

3.7. Mikronükleus (MN) Sıklığını Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi, Preparatların Hazırlanması, Boyanması ve Mikroskopik İncelemeler

3.7.1. Hücre Kültürünün Yapılması, Test Maddelerinin Kültüre İlave Edilmesi ve Preparatların Hazırlanması

MN sıklığını saptamak için, sağlıklı ve sigara içmeyen 25-30 yaş arası dört erkek donörden alınan, 1/10 oranında heparinize edilmiş kan örneklerinden kromozom medyumlarına steril şartlarda 0,2 ml ekildi. Hücre kültürü 37°C'de 68 saat için inkübe edildi. SO₂'in etkisini incelemek için daha önce belirlenmiş olan konsantrasyonlar (1.00, 0.50, 0.05 ppm) kültür tüplerine ilave edildi ve hücrelerin 68 saat boyunca SO₂ ile muamele edilmeleri sağlandı. İki nükleuslu hücre oluşumunu sağlamak için de kültürün bitimine 24 saat kala (44. saatte) bütün tüplere son konsantrasyon 6 ug/ml olacak şekilde sitokalsin B ilave edildi. Ayrıca pozitif kontrol olarak Siklofosfamid kullanıldı, Siklofosfamid tüplere 160 ng/ml olacak şekilde verildi. Kültür süresi olan 68 saatin bitiminde kültür tüpleri 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi, süpernatant atıldı. Dipte kalan ve hücreleri içeren 0,5-0,7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, +4 °C'de tutulan soğuk hipotonik ilave edildi. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve vorteks ile karıştırarak yapıldı. Hücreler 5 dk hipotonik eriyikte +4 °C'de muamele edildi. Sürenin sonunda tüpler 10 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. süpernatant atıldı. Hipotonik eriyik ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 6 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edildi. İlk fiksatif 1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol karışımının 1/1 oranında %0,9

NaCl ile seyreltilmesiyle hazırlandı. Oda sıcaklığında 15 dk fiksatif ile muamele edilen hücreler 1000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edildi. Bu işlem 2 kere tekrarlandı ve ilk fiksatiften farklı karışımlar kullanıldı (1 kısım asetik asit 5 kısım metil alkol). Son santrifüjden sonra dipte 0,5-0,7 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra preparat yapma işlemine geçildi. Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirildi. Daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine farklı alanlara 1'er damla olmak üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 4-5 damla) hücrelerin lam üzerinde yayılması sağlandı. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumak üzere 24 saat oda ısısında bekletildi (91).

3.7.2. Preparatların Boyanması

Hazırlanan preparatlar %5'lik giemsa boyası ile 10 dakika boyunca boyandı.

%5'lik Giemsa'nın Hazırlanması: 5 ml Giemsa 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlandı.

3.7.3. Mikroskopik İnceleme

Daimi hale getirilmiş olan preparatlar binoküler ışık mikroskopunda 40'luk objektif ile incelendi (x400). Bu incelemeler sırasında her bir bireyden hazırlanan preparatlardan toplam 1000 binükleer hücre sayıldı, bünükleer hücrelerden mikronükleuslu olanlar belirlendi. Bu verilerden MN %'si saptandı (88).

3.7.3.1. MN Sayısının Saptanması

MN ayırımı Fenech (92) tarafından belirlenen kriterlere göre yapıldı. Bu kriterlere göre;

- 1) Ana nükleus ve MN, nükleus zarıyla çevrili yuvarlak ya da oval olmalıdır,
- 2) MN'ler ana nükleusun 1/3'ünden küçük ve 1/16'sından büyük olduklarında değerlendirilmelidir,
- 3) MN'ler ana nükleus gibi boyanmalıdır.
- 4) MN'ler ana nükleustan açık bir şekilde ayrılmış olmalıdır.

Sitokinez bloklama yönteminin en önemli yararı, bölünen hücre popülasyonunda nükleus bölünmesinin ilerleyişini ve çoğalmasını ölçebilmesidir. Bu durum, Cyt-B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu, multinükleuslu (>2) hücrelerin sayılmasıyla yapılır.

3.8. İstatistiksel Analiz

Beş grubun KKD, KA, MI, RI, MN parametrelerine ait verilerin istatistiksel olarak değerlendirmelerinde Windows for SPSS Version 16.0 yazılım programı kullanıldı. Bu beş grubun KKD, KA, MI, RI, MN değişkenleri açısından karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar Conover testi ile yapıldı. $P < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Veriler Median (Min- Max) olarak sunuldu).

4. BULGULAR

4.1. Besiyerlerinde SO₂ miktarı değişimi

Tüm gruplarda kültürden önce ve sonra iki kez SO₂ miktarı ölçümü yapıldı. Buna göre tüm gruplarda SO₂ miktarı arttı (Tablo 4.1). Başlangıçta lenfosit kültürlerini yapmak için kullandığımız besiyeri miktarı 5 ml idi. Ekim işlemi yapılarak 72 saat inkübasyona bırakılan besi yeri ortamında kan hücrelerinin üremesi sağlandı. Amino asitler, mineraller, tuzlar ve diğer maddelerle zenginleştirilmiş olan besi yeri kan hücreleri tarafından çoğalabilmek için inkübasyon süresince kullanıldı. Dolayısıyla 0. saatte 5 ml olan besi yerini hücreler tarafından kullanılırken, hücre sayısının başlangıçtaki hücre sayısına göre artması besi yeri miktarının ise azalması beklenir. Bu süre esnasında bir takım reaksiyonların meydana geldiği buna göre azalan kütle miktarına karşılık ortamın SO₂ bakımından zenginleştiği düşünülmektedir.

Tablo 4. 1.'de görüldüğü gibi uygulanan tüm dozlarda 0. saatte ölçülen SO₂ değeri ile 72.saatteki değer arasındaki artışın birbirine yakın değerler olduğu görüldü.

Tablo 4. 1. Farklı dozlarda uygulanan SO₂'nin Analytik Jena Multi EA UV Dedektörlü Kükürt Tayin Cihazında Ölçülmesi

Gruplar		Konsantrasyon 0.saat (mg/kg)	Konsantrasyon 72.saat (mg/kg)
Kontrol		890,3	921,5
SO ₂	Minimum	848,6	910,4
	Orta	924,9	979,7
	Maksimum	955,1	1,02 (g/l)

4.2. SO₂'nin Kardeş Kromatid Değişimi Üzerindeki Etkileri

SO₂'nin 72 saatlik muamele sonrasında kullanılan tüm konsantrasyonlarda KKD'nin kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Bu artış pozitif kontrol, maksimum ve orta doz uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, minimum doz uygulanan grupta kontrol grubuna göre az da olsa bir artış gözlenmesine rağmen bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. (P< 0.05).

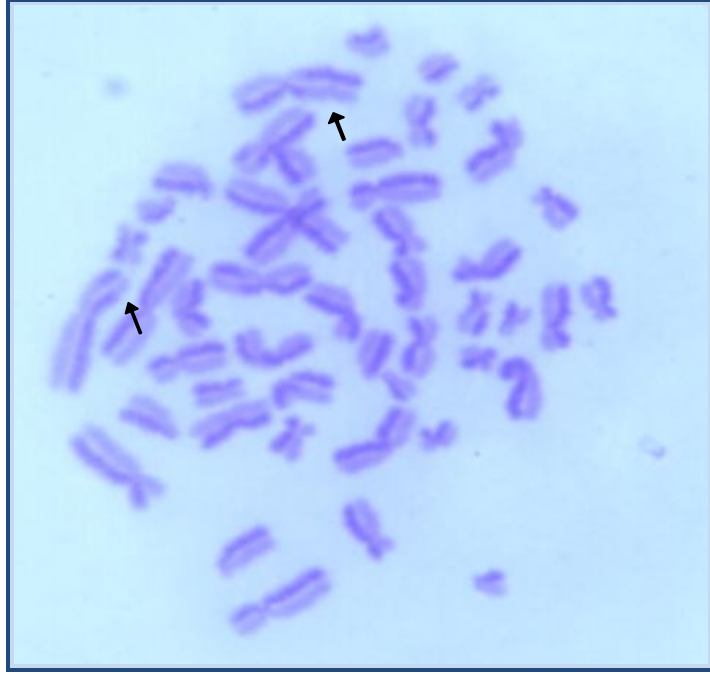
KKD'deki en fazla artış maksimum doz uygulaması yapılan grupta gözlenirken bu artış diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4. 2) (P< 0.05).

Tablo 4. 2 Değişik dozlarda SO₂'nin 72 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde hücre başına düşen ortalama KKD sayısı.

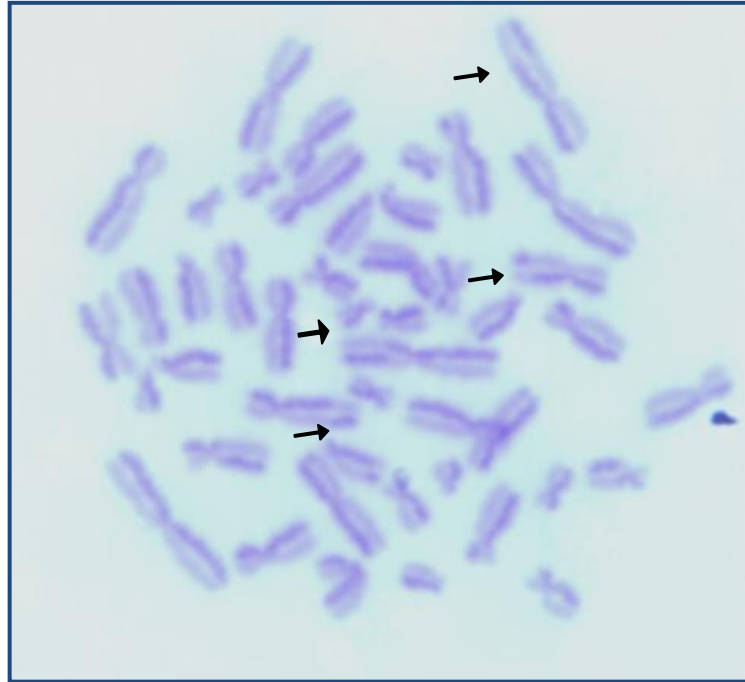
Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon	KKD Median (Min-Max)
Kontrol	72	0	0,85 (0,76- 1,00)
Pozitif Kontrol (Siklofosfamid)	72	160 (ng/ml)	1,66 (1,52 - 3,40) ^a
SO ₂ Minimum	72	0,05 ppm	0,74 (0,60-2,08)
Orta	72	0.50 ppm	2,28 (1,24- 4,08) ^a
Maksimum	72	1.00 ppm	4,62 (4,24 -6,40) ^a

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. P< 0.05

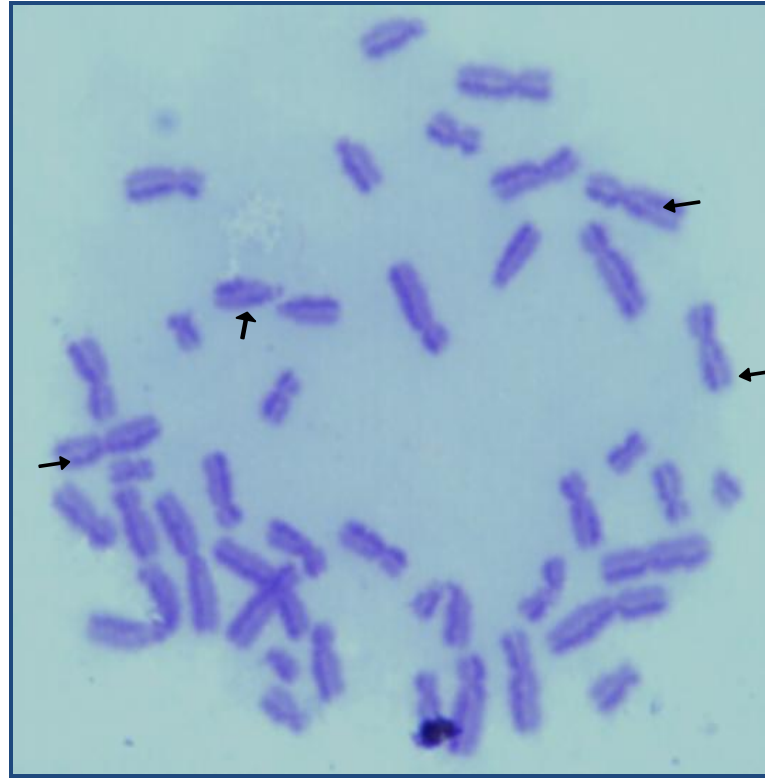
*: Toplam 100 hücre



Şekil 4. 1. Minimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde 1 KKD



Şekil 4. 2. Orta dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde 1 KKD



Şekil 4. 3. Maksimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KKA

4. 3. SO₂'nin Kromozom Aberasyonları Oluşumu Üzerindeki Etkileri

SO₂ ile 72 saat boyunca maksimum, orta ve minimum dozlarda muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromozom aberasyonlu hücre oranının pozitif kontrole göre arttığı gözlenirken (Tablo 4. 3) bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu. KA sayısındaki en fazla artışın maksimum SO₂ uygulanan grupta olduğu gözlemlendi. KA minimum, orta ve maksimum doz uygulanan gruplarda orantılı bir şekilde artı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P< 0.05).

SO₂'nin insan periferel lenfositlerinde kromozom aberasyonları arasında en çok kromatid kırığı, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, disentrik oluşum ve poliploidiye neden olduğu gözlemlendi (Şekil 4. 4, Şekil 4. 5, Şekil 4. 6, Şekil 4. 7, Şekil 4. 8, Şekil 4. 9, Şekil 4. 10).

Tablo 4. 3. Değişik dozlarda muamele edilen insan periferel lenfositlerinde KA yüzdesi

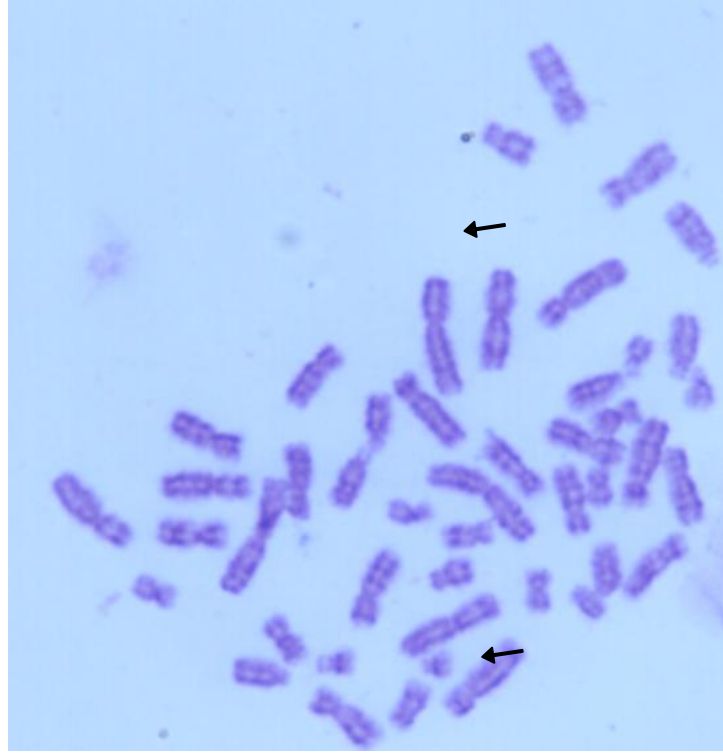
Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon	Median (Min-Max) KA	
Kontrol	72	0	0	
Pozitif Kontrol (Siklofosamid)	72	160(ng/ml)	1,50 (1,00-3,00)	
SO ₂	Minimum	72	0,05 ppm	7,00 (4,00-10,00) ^a
	Orta	72	0,50 ppm	6,50 (6,00-10,00) ^a
	Maksimum	72	1.00 ppm	9,00 (4,00-12,00) ^a

a: Pozitif Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. P< 0.05

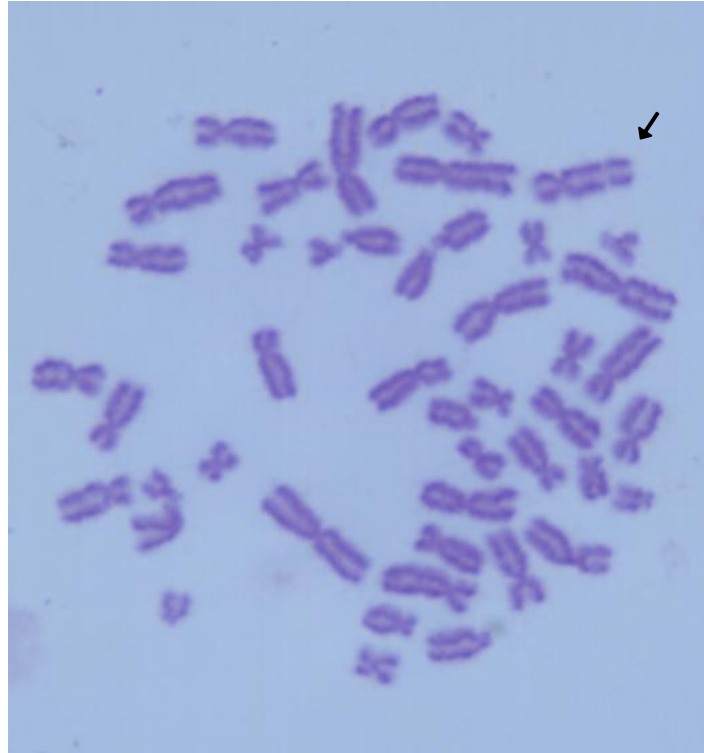
*: Toplam 400 hücre



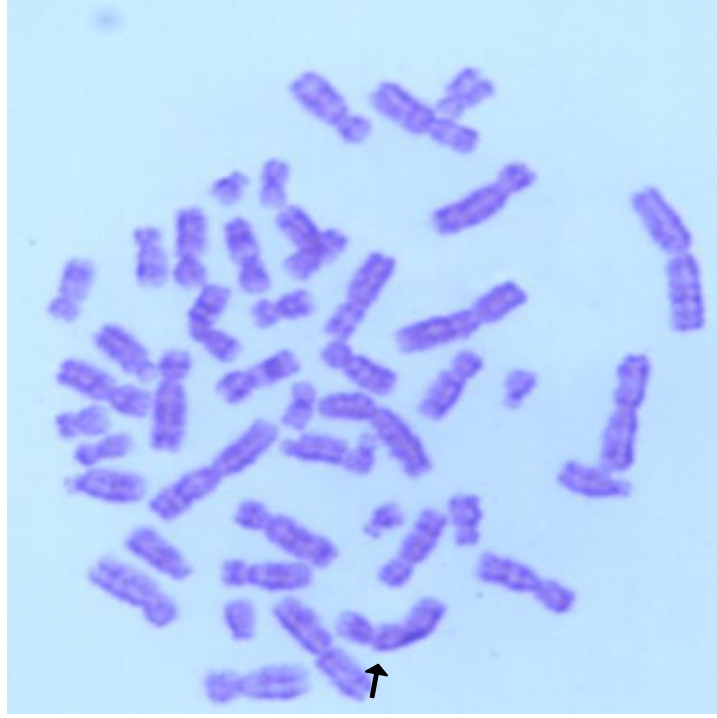
Şekil 4. 4 Minimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatit kırığı



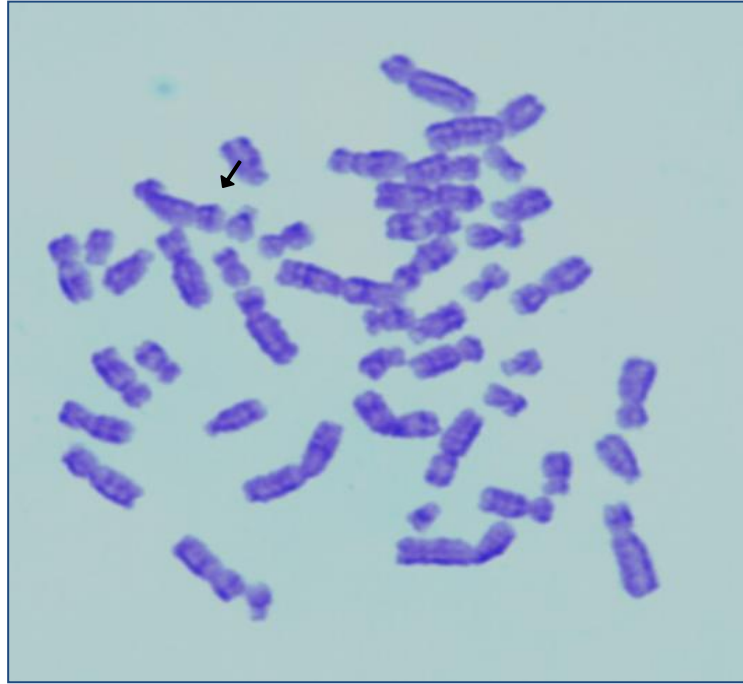
Şekil 4. 5 Orta dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatit kırığı



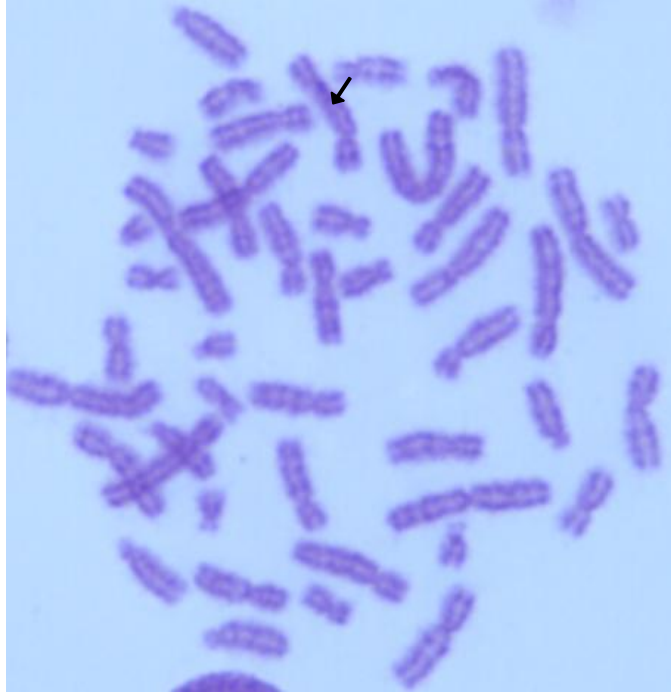
Şekil 4. 6. Maksimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde kromatit kırığı



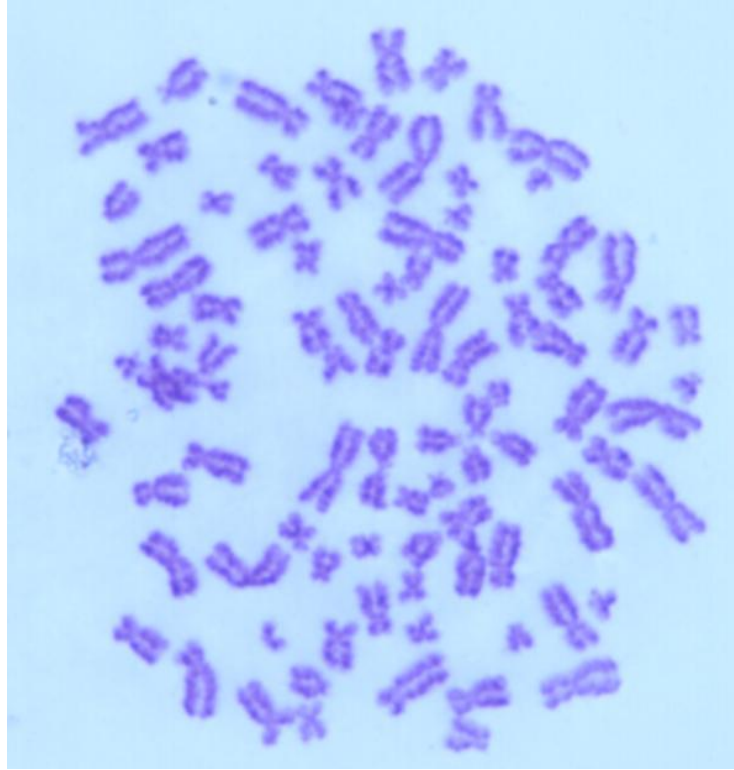
Şekil 4. 7. Minimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde disentrik oluşum



Şekil 4. 8. Orta dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde disentrik oluşum



Şekil 4. 9. Maksimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde disentrik oluşum



Şekil 4. 10. Maksimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferel lenfositlerinde poliploidi

4. 4. SO₂'nin Mikronükleus Sıklığı Üzerindeki Etkileri

SO₂'in 72 muamele süresinde tüm konsantrasyonlarda, insan periferik lenfositlerinde MN'li binükleer hücre sayısında artış gözlemlendi (Tablo 4. 4). Kontrol grubuna göre pozitif kontrol, maksimum ve orta dozda SO₂ ile muamele edilen gruplardaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunurken SO₂'in minimum uygulandığı gruptaki artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P<0.05).

MN sayısındaki en fazla artış pozitif kontrol grubunda gözlenirken bu artış diğer bütün gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu (P<0.05). Yapılan mikroskopik incelemelerde bir mikronükleuslu (Şekil 4.11) ve iki mikronükleuslu (Şekil 4. 12.) hücrelere rastlandı.

Tablo 4. 4. Değişik dozlarda 72 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde MN'li binükleer hücre.

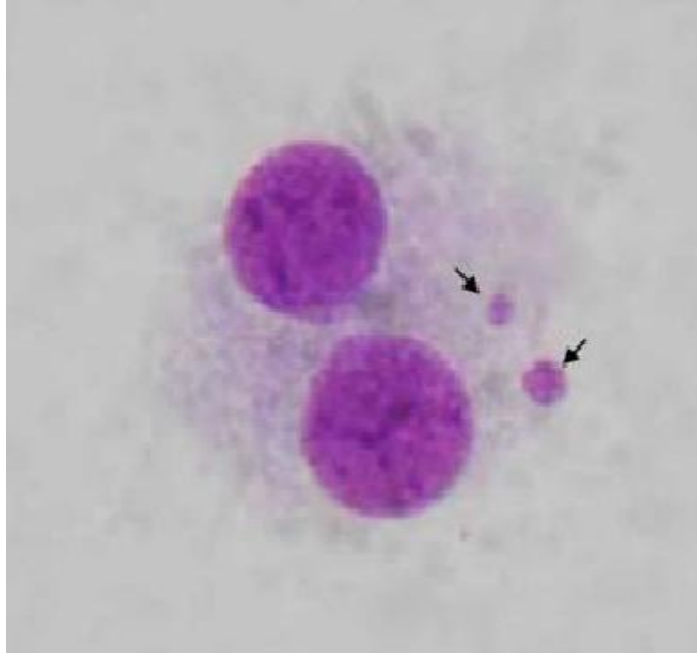
Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon	Median (Min-Max) MN
Kontrol	72	0	1,50 (1,00-2,00)
Pozitif Kontrol (Siklofosfamid)	72	160(ng/ml)	9,50 (8,00-12,00) ^a
SO ₂	Minimum	0,05 ppm	2,00 (1,00-4,00)
	Orta	0,50 ppm	4,50 (3,00-5,00) ^a
	Maksimum	1.00 ppm	5,50 (4,00-8,00) ^a

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. P< 0.05

*: Toplam 1000 hücre



Şekil 4. 11. Orta dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde Mikronükleuslu içeren binükleer hücre (x1000).



Şekil 4. 12. Maksimum dozda SO₂ ile muamele edilen insan periferal lenfositlerinde iki Mikronükleus içeren binükleer hücre (x1000).

4. 5. SO₂'nin DNA Replikasyonu ve Mitoz Bölünme Üzerindeki Etkileri

SO₂'nin DNA replikasyonu üzerindeki etkisi RI'nin, mitoz bölünme üzerindeki etkisi ise MI'in hesaplanması yoluyla saptandı. Bütün dozlarda SO₂, 72 saatlik muamele süresinde RI'ni kontrole göre düşürdü. RI'deki bu düşüş en fazla pozitif kontrol grubu ile maksimum dozda SO₂'ye maruz kalan gruplarda gözlemlendi. Kontrole göre RI'deki azalma bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.5) (P< 0.05).

SO₂ doza bağlı olarak tüm konsantrasyonlarda MI'i düşürdü. Kontrole göre minimal dozda MI'da fark görülürken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P< 0.05). MI üzerinde en etkili dozun maksimum SO₂ dozu olduğu gözlemlendi. Maksimum doz ile diğer tüm gruplar arasında fark görülürken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 4.5) (P< 0.05).

Tablo 4. 5. Değişik dozlarda SO₂ ile muamele edilen insan periferik lenfositlerinde RI ve MI

Gruplar	Süre (saat)	Konsantrasyon	MI* Median (MinMax)	RI** Median (Min-Max)
Kontrol	72	0	13,10 (9,30-17,57)	2,515 (2,48 -2,56)
Pozitif Kontrol (Siklofosfamid)	72	160 (ng/ml)	8,54 (4,21-12,28) ^a	1,42 (1,41-1,49) ^a
SO ₂	Minimum	0,05 ppm	8,58 (7,08 -11,76)	2,25 (2,18 -2,34) ^a
	Orta	0,50 ppm	7,76 (6,98 -7,92) ^a	2,15 (1,69-2,33) ^a
	Maksimum	1.00 ppm	4,02 (3,54 -4,31) ^a	1,37 (1,30-1,52) ^a

a: Kontrol ile karşılaştırmada fark önemli. P< 0.05

*: Toplam12000 hücre

** : Toplam400 hücre

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, farklı dozlarda SO₂'nin insan lenfosit hücrelerinde olası genotoksik ve sitotoksik etkilerinin sitogenetik parametreler kullanılarak araştırılması üzerine kurgulanmıştır. SO₂ hava kirliliği oluşturan gazlardan birisi olması sebebiyle çok sayıda insanı etkileyebilme potansiyeline sahiptir. Epidemiyolojik çalışmalar akciğer kanseri de dâhil olmak üzere solunumla ilgili birçok hastalığın SO₂ ile ilişkili olduğunu göstermektedir (93, 94, 95). Solunum yoluyla alınan SO₂ kolayca bisülfid ve sülfite türevlenebilen sülfürik asite hidrate olabilmektedir. Nemli vücut ortamında SO₂'den hızla oluşan bu metabolitler kan yoluyla tüm vücuda taşınmaktadır. Bisülfid/sülfid türevleri ayrıca yiyecek, içecek ve ilaçlar ile de vücuda alınmaktadır. SO₂'nin ve türevlerinin toksik etkileri ise pek çok biyolojik sistemde gösterilmiştir (94, 95, 96, 97).

Malatya ve yöresi kayısı üretiminde en önemli merkezlerden birisidir. Kayıslarda renk kararmasını önlemek, kuruma süresini kısaltmak, böceklenmeyi önlemek ve muhafaza süresini uzatmak amacıyla kayısı hasadından sonra ve kayısı entegre fabrikalarında yoğun kükürtleme yapılmaktadır.

Çalışmamızda, insan periferik lenfositleri *in vitro* olarak maksimum doz için 1.00 ppm, orta doz için 0.50 ppm ve minimal doz için 0.05 ppm konsantrasyonlarında SO₂ ile 72 saat muamele edildi. Bu dozlar bir çok şehirdeki standart atmosferik SO₂ konsantrasyonlarına (0,1–10 ppm) yakın değerlerdir (95). Kayısı entegre fabrikalarında ve tarım işçilerinde maruz kalınan SO₂ miktarı tam bilinmemekle birlikte atmosferik değerin çok üzerinde olacağı açıktır. Köksal ve arkadaşları islimleme odalarında kükürtleme sonrası kapı açılır açılmaz havaya dağılan SO₂ miktarını manual konduktimetrik cihazı kullanarak 107–721 ppm aralığında bir değerde bulmuşlardır (5). İşçiler bu dozlardaki SO₂'e yaklaşık bir saat süre ile maruz kalmaktadır. Ancak bu konsantrasyonlardaki atmosferik SO₂'in büyük kısmı açık havada çevreye yayılacak, konsantrasyonu belirlenemeyen bir oranı ancak kişilere ulaşacaktır. Ayrıca gaz maruziyeti kişisel farklılık gösterebileceği gibi solunan gaz hızla vücut içinde metabolize olacaktır. Yaptığımız literatür taramalarında deney modelimize uygun insan lenfosit hücrelerine *in vitro* şartlarda SO₂ uygulamasına rastlayamadığımız için deney öncesi *in vitro* letal doz belirleme

çalışmaları yaptık. Bu ön çalışmada kültürdeki hücrelerin %100'ünü öldüren doz 1,50 ppm ve %50'sini öldüren doz 1,00 ppm olarak belirlendi. Bu verilerden yola çıkarak LD50'ye denk gelen 1,00 ppm maksimum doz olarak uygulanırken diğer dozlar ise bu değerin azalan katları şeklinde belirlendi.

Kimyasalların olası genotoksik etkilerinin sitogenetik parametrelerle belirlemek için yapılan çalışmalarda, uygulanan kimyasalların maruziyet süresi hücre siklusu dikkate alınarak 24, 48 veya 72 saat olarak belirlenir (98). Bu çalışmada kültürdeki memeli hücrelerinin hücre siklusu 24 saat olduğu için, ikinci ve üçüncü mitozların gözlenebilmesi için KKD ve KA testlerinde 72 saat inkübasyona bırakılırken, MN testinde ise 68 saat inkübasyona bırakıldı. Bunun yanı sıra hiçbir kimyasalın kullanılmadığı negatif bir kontrol grubu ve Siklofosfamid eklenmiş pozitif kontrol grupları kullanıldı.

Tüm gruplarda kültürden önce ve sonra SO₂ miktarı son derece hassas kükürt tayin cihazı ile ölçüldü. Buna göre tüm gruplarda SO₂ miktarı arttı. Başlangıçta lenfosit kültürlerini yapmak için kullandığımız besiyeri miktarı 5 ml idi. Ekim işlemi yapılarak 72 saat inkübasyona bırakılan besi yeri ortamında kan hücrelerinin üremesi sağlandı. Amino asitler, mineraller, tuzlar ve diğer maddelerle zenginleştirilmiş olan besi yeri kan hücreleri tarafından çoğalabilmek için inkübasyon süresince kullanıldı. Dolayısıyla 0. saatte 5 ml olan besi yeri hücreler tarafından kullanılırken, hücre sayısının başlangıçtaki hücre sayısına göre artması besi yeri miktarının ise azalması beklenir. Bu süre esnasında bir takım reaksiyonların meydana geldiği buna göre azalan kütle miktarına karşılık ortamın SO₂ bakımından zenginleştiği düşünülmektedir.

Siklofosfamid insanlarda ve hayvanlarda karsinojenik olarak rol oynamaktadır. Aktif bileşenleri Akrolein ve Fosforamid olup (99), bu bileşenler DNA'ya kovalent bağ yaparak DNA sentezi için ihtiyaç duyulan proteinleri (transkripsiyon faktörlerini) inaktif hale getirmekte ve hücrelerin gelişimini yavaşlatmaktadır (99, 100). Siklofosfamid'in genotoksik etkileri çoğu araştırmacı tarafından *in vitro* ve *in vivo* olarak test edilmiş ve birbirini destekleyen tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Birçok kanser tedavisinde kullanılan Siklofosfamid ve diğer bazı kemoterapik ajanların, tedavi sonrası somatik hücrelerde gen mutasyonlarına, kromozom aberasyonlarına ve anöploidilere yol açtığı gösterilmiştir (99).

5.1. SO₂'nin Hücre Bölünmesi Üzerine Etkisi

SO₂ gazına maruz bırakılan deney gruplarının tümünde mitotik indeks kontrole göre önemli ölçüde azaldı. Hatta maksimum doz uygulanan grupta bu düşüş pozitif kontrolden bile daha fazla olmuştur. Bu durum SO₂'in antimitotik etkisinin bariz göstergesidir. SO₂'in sitotoksik etkisi birçok çalışmada değişik yönleriyle rapor edilmiştir (12–18). SO₂'nin nörotoksitesini belirlemek için yapılan bir çalışmada, SO₂'nin sıçan hipokampusunda protein oksidasyonunu, DNA-protein etkileşim oranını ve apoptik protein ve enzimlerin ifadesini arttırdığı bildirilmiştir (101). Yun ve ark. bir hafta süre ile 7, 14 ve 28 mg/m(3) SO₂ inhalasyonunun sıçan kalp ve akciğerlerinde pro-apoptik ve pro-inflamator genlerin ifadesini artırarak oksidatif stresi artırdığını, DNA hasarı yaptığını ve membran kanal fonksiyonlarını değiştirdiğini bildirmişlerdir (102). Bu sonuçlar SO₂'in mitotik bir inhibitör olabileceğini göstermektedir. Bu duruma yol açan olasılıklardan biri; SO₂'nin kromozomal aberasyonu tetiklemesi, sitozinin urasile deaminasyonu ve DNA modifikasyonu yoluyla kromozomal hasarı indüklemesi iken bir diğer olasılık SO₂'e bağlı kromozomal hasar, katalizlenmiş enzim oksidasyonu veya SO₄⁻, SO₅⁻, SO₃⁻ gibi oksijen merkezli serbest radikaller olabilir (14). Bisülfid ve tek elektron oksidasyon bir peroksil radikal formu moleküler oksijen ile hızla reaksiyona girerek sülfür trioksit radikal anyonu üretir. SO₂ tarafından oluşturulan serbest radikaller nükleik asitlere zarar verebilir ve mutasyonu indükleyebilir (36). SO₂ maruziyeti sonucu serbest radikal oluşumuna karşı radikal süpürücü antioksidan enzimlerin aktivitesinin arttığı da rapor edilmiştir (103).

5.2. SO₂'nin insan Lenfosit Hücrelerinde Kromozom Aberasyonu, Kardeş Kromatid Değişimi ve Mikronükleus Oluşumu Üzerine Etkileri

Çalışmamızda SO₂ gazı, uygulama dozuna bağlı olarak KA, KKD ve MN sıklığında önemli artışa neden oldu. Çalışma verilerine dayanarak SO₂'nin kuvvetli klastojenik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. SO₂ DNA molekülünün şeker fosfat omurgasındaki fosfodiester bağlarını koparması yoluyla yapısal kromozom anormalliklerine, ayrıca iğ ipliği zehri gibi davranarak iğ ipliği mikrotübüllerinin oluşumunu engellemesi yoluyla sayısal kromozom anormalliğine sebep olmaktadır. Bundan dolayı da SO₂'nin genotoksik risk taşıyabileceği söylenebilir. *İn vitro*

şartlarda SO₂'in kromozomal düzeydeki genotoksik etkilerine ilişkin yeterli bilgiye ulaşamamıştır. Ancak bir çalışmada *in vitro* olarak kültüre edilmiş insan kan lenfositlerinde SO₂ türevlerinin (sodyum bisülfid ve sülfid) doza bağlı olarak mikronükleus, kardeş kromatid değişimi ve kromozomal aberasyonları arttırdığı ve mitotik indeksi ise azalttığı bildirilmiştir (14,15). Daha önce yapılmış bazı araştırmalarda çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları destekleyici veriler bulunmaktadır. Örneğin Meng ve Zhang (12,13) kronik olarak SO₂ gazına maruz kalan fabrika işçilerinin lenfosit hücrelerinde kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi sıklığının kontrole göre çok arttığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların bir başka çalışmalarında ise SO₂ inhalasyonunun fare kemik iliği hücrelerinde izokromozom ve kromatid kırıkları gibi yapısal kromozom aberasyonlarında artışa neden olduğu rapor edilmiştir.

Bizim çalışmamızda da SO₂'nin bütün dozlarında kromozom aberasyonlarında kontrole göre artış gözlenmiştir. Çalışmamızda en çok kromozom kırığı, kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik oluşumlar ve poliploidi görülmüştür. Bu sonuçlar SO₂'nin klastojenik ve genotoksik bir ajan olabileceğini göstermektedir. Görüldüğü gibi SO₂'nin genotoksik etkileri aşırı doz ve uygun olmayan kullanım metotlarından da kaynaklanabilmektedir. Bu çalışmada çok düşük dozlarda bile SO₂ yapısal kromozom anormalliklerini artırmıştır.

Genotoksitenin belirlenmesinde kullanılan bir yöntem de kardeş kromatid değişimi sıklığının ölçülmesidir. KKD'nin normalden yüksek olması, kimyasal ajanların klastojenik etkisinin bir göstergesidir. KKD, yeni eşleşmiş kromatid ve bunun kardeş kromatidi arasında karşılıklı değişim olup, S fazıyla ilgili bir tamir işlemidir. Kullanılan kimyasala bağlı olarak KKD frekansındaki artış, onun replikasyon mekanizmasını etkileyerek DNA hasarı oluşturabildiğinin kanıtıdır (60). Araştırmamızda KKD'nin belirlenebilmesi için 2.mitoz (M2) bölünmeyi geçiren toplam 100 hücre incelenmiştir. Orta ve maksimum SO₂ doz uygulamalarında KKD frekansında artış oluşturduğu belirlenmiştir. Meng ve Zhang, kronik olarak SO₂ gazına maruz kalan fabrika işçilerinin lenfosit hücrelerinde KKD frekansının yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (13).

Çalışmamızda kullanıldığımız başka bir genotoksite testi ise mikronükleus testidir. MN, oldukça güvenilir olan bir mutajenite testidir. Her bir hücredeki nükleus

sayısı, cytochalasin-B ilavesi ile nükleer bölünmelerin sayısını göstermektedir. Bu testte yalnızca binükleer (iki çekirdek içeren) hücreler sayılmaktadır çünkü bu hücreler sadece bir kez hücre bölünmesi geçirmiş hücre grubudur. Kükürt içeren izotiyosiyanatlar (ITCS) turpgiller ailesinde bulunan temel olarak kükürt içeren metabolitlerdir. ITCS'lerden bazılarının yüksek proliferatif kanser hücrelerinin hücre döngüsü ilerlemesinin modüle edilmesinde, apoptozisin indüklenmesinde ve farklı tümör hücre tiplerine karşı kimyasal önleyici olarak rol oynadığına ait veriler mevcuttur. Ayrıca benzil ITC ve fenil ITC gibi bazı ITCS için kanserojen ve ya genotoksik etkileri bildiren çalışmalar da vardır. Sağlıklı hücreler için genotoksite yokluğu ve yeni kimyasal önleyici ajanlar için öncelikle gerekli olmasından dolayı insan T-lenfosit kültüründeki ITCs karışımı sulforaphane, 4-(metiltiy) butylisothiocyanate (MTBITC) ile apoptozis indüksiyonu ve mikronükleus oluşumu araştırılmıştır. MTBITC, sulforaphane ve ITCS karışımı mikronükleusa neden olmadığını göstermektedir. Ayrıca sulforaphane test edilen en yüksek konsantrasyonda (30 μ M) apoptik hücrelerin çoğunda doza bağlı olarak artışa neden olmuştur (104). Araştırmamızda, SO₂ uygulanan tüm konsantrasyonlarda, insan periferik lenfositlerinde MN'li binükleer hücre sayısını kontrole göre arttırmıştır. Minimum uyguladığımız doz dışındaki tüm gruplar arasında anlamlı bir fark görülmüştür. Maksimum dozda pozitif ve negatif kontrol grubu ile minimum doz uyguladığımız grup arasında anlamlı bir fark gözlenirken orta doz ile anlamlı bir fark saptanmadı.

Meng ve arkadaşları, SO₂ türevlerinin diyet olarak verildiği farelerde çeşitli doku hücrelerindeki DNA hasarını tek hücre elektroforez tekniği (SCGE) ile araştırmışlar ve DNA hasarlarının daha çok tek zincir kırıkları, alkalin işaretli hasarlar ve tamir bölgelerinin eksilmesi şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (105). Bakteriyel ve memeli hücrelerinde SO₂ ve türevlerinin DNA hasarı ile ilgili değişik test sistemleri sonucu elde edilmiş bilgiler olmasına karşın mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda SO₂ türevlerinin DNA'nın alkali-sensitif bölgelerde veya tamir bölgelerinde sitokinleri urasile dönüştürerek veya guanin-adenin transversiyonu yaparak DNA hasarına yol açtığı prokaryotik hücre modellerinde gösterilmiştir (106).

Yüksek frekanstaki kromozomal anomaliler ile kanser riski arasında anlamlı bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (78). SO₂'nin kanser başlatıcı, tümör geliştirici ve ilerletici potansiyelinin olabileceği birçok çalışmada bildirilmiştir (107). SO₂'nin reaktif elektrofilleri ya da glutatyon konjugasyonunun enzimatik inhibisyonu yoluyla ksenobiyotik bileşiklerin detoksifikasyon mekanizmasını etkileyerek kansere neden olabileceğini bildirmişlerdir (108). Burada glutatyon konjugasyonunun akciğerde benzopiren epoksitlerin eliminasyonunda ana yolak olduğuna dikkat etmek gerekir. İnsan ve deney hayvanlarında akciğer kanseri insidansı ile SO₂ maruziyeti arasında güçlü korelasyon gözlenmiştir (93).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda multipl hücre döngüsü düzenleyici proteinlerin sentezi ve ifadesinde genetik ve epigenetik etkileşimler sonucu oluşan değişikliklerin SO₂ toksisitesinde kilit rol oynadığı gösterilmiştir. SO₂ karsinojenik etkilerini iki şekilde yapmaktadır.

1. Doğrudan kanser ile ilişkili genlerde (onkogen, tümör supressör genler, apoptik genler veya metabolitik enzim genleri) doğrudan mutasyon yaparak veya bu genlerin ifadesini değiştirerek hücre transformasyonunu başlatmaktadır. SO₂ protoonkogenlerin (c-fos, c-jun, c-myc, ve Ki-ras), apoptik genlerin (kaspaz -3, kaspaz-8 ve kaspaz-9) ve kanserle ilişkili metabolitik genlerin (CYP1A1, CYP1A2) ekspresyonunu artırırken tümör supressör genlerin (p53, Rb ve p16) ekspresyonunu baskılamaktadır (107, 108, 109). Bu genlerin hücre büyüme, bölünme, farklılaşma ve apoptozunda kilit rol oynadıkları bilinmektedir.

2. Hücre içi serbest radikalleri artırarak oksidatif hasar yoluyla DNA hasarı yapabilmektedir. Klonotif hücre bölünmeleri sonucunda biriken DNA hasarları ayrıca DNA tamir mekanizmasının bozulması ile karsinojeniteyi başlatmaktadır (102,105).

SO₂'nin çeşitli hücrelerde yapısal hasarlara yol açarak histopatolojik etkiler gösterdiği elektron mikroskopik analizlerle gösterilmiştir (97).

Bu bilgiler ve yaptığımız çalışmalar doğrultusunda SO₂'nin doza bağlı olarak genetik materyalde hasar meydana getirdiğini ve kanser başta olmak üzere DNA hasarı ile ilişkili pek çok hastalığa neden olabilecek potansiyele sahip olduğunu söyleyebiliriz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada maksimum, orta ve minimum olmak üzere 72 saatlik süreler ile insan periferik lenfositlerine SO₂ uygulaması yapıldı. Çeşitli sitogenetik testler kullanılarak oluşabilecek genetik hasarın tespitinde SO₂'nin genotoksik etkilerinin çok yönlü araştırılması amaçlandı. Sonuçta, SO₂ uygulaması doz artışına bağlı olarak kullanılan tüm testlerde belirgin genotoksisite ve sitotoksisite gösterdi.

Daha önce yapılan çalışmalardan ve bizim bulduğumuz sonuçlardan yola çıkarak SO₂'nin sitotoksik ve genotoksik bir gaz olma riski taşıdığını söyleyebiliriz. Yüksek konsantrasyonlara maruz kalındığı takdirde ciddi genetik hasar oluşturabilme, buna bağlı olarak hücre proliferasyonunu etkileyerek kansere neden olma olasılığı yüksektir. SO₂'nin genotoksisitesi hakkında daha fazla bilgiye sahip olunması için farklı dozlarda *in vitro* çalışmaların yanı sıra özellikle Malatya yöresinde SO₂ toksisitesine maruz kalan tarım işçilerinde *in vivo* çalışmaları da yapılması gerekmektedir.

Araştırmamızın sonuçlarına göre, SO₂'nin genotoksik risk potansiyeline sahip bir ajan olduğunu söyleyebiliriz.

KAYNAKLAR

1. Köksal, N., Hasanoğlu, HC., Gökırmak, M., Yıldırım, Z., Gültek, A. (2003). Apricot sulfurization: an occupation that induces an asthma-like syndrom in agriculture environments. *Am J Ind Med*, 43, 447–453.
2. Dökmeci, İ., Dökmeci, H. (2005). *Toksikoloji, Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*. İstanbul. Nobel Yayınevi.
3. Plunkett, E.R. (1922). *Handbook of Industrial Toxicology*
4. Meng, Z., Zhang B. (2002). Induction effects of sulfur dioxide inhalation on chromosomal aberrations in Mouse bone marrow cells. *Mutagenesis*, 17(3) : 215–7.
5. Köksal, N., Yıldırım, Z., Gökırmak, M., Hasanoğlu, HC., Mehmet, N., Avcı, H. (2003). The role of nitric oxide and cytokines in asthma-like syndrome induced by sulfur dioxide exposure in agricultural environment. *Clin Chim Acta*, 336: 115–22.
6. Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P. (2001). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology*, 34: 86-99.
7. ICH S2A. (1995). Genetic toxicity studies: Guidance on specific aspects of regulatory tests for pharmaceuticals. Available at: www.ich.org.
8. Klaassen, C.D. (Ed.). (2001) *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science o/Poisons* (6th ed). New York, McGraw-Hill.
9. Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A.R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, Wu, W.,Guan, J., Terzoudi, G., Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation, *Cytogenet Genome Res*, 104:14.
10. Demirel, S., Zamani, A.G.(2002). Mikronükleus Tekniği ve Kullanım Alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12(3): 123–127.
11. Norppa, H., Falck, GC. (2003). What do human micro nuclei contain. *Mutagenesis vol.* 18(3), 221–233.
12. Meng, ZQ., Zhang, LZ. (1990). Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes of workers exposed to sulphur dioxide. *Mutat. Res.* 241(1):15–20.

13. Meng, ZQ., Zhang, LZ. (1990). Observation of frequencies of lymphocytes with micronuclei in human peripheral blood cultures from workers in a sulphuric acid factory. *Environ. Mol. Mutagen*, 15(4): 218–20.
14. Meng, Z., Zhang, L. (1992). Cytogenetik damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfit. *Mutat. Res*, 298(2): 63–9.
15. Meng, Z., Zhang, L. (1994). Chromosomal aberations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced in human lymphocytes by sodium bisulfit (sulfur dioxide). *Yi Chuan Xue Bao*, 21(1): 1–6.
16. Yadav, JS., Kaustik, VK. (1996). Effect of sulphur dioxide exposure on human chromosomes. *Mutat. Res*, 16, 359(1): 25–9.
17. Meng, Z., Ruan, A., Sang, N., Zhang, B., Zhang, J. (2002). Micronuclei induced by chronic inhalation of SO₂ in Mouse bone marrow cells. *Human Jing Ke Xue*, 23(4): 123–5.
18. Meng, Z., Ruan, A., Sang, N., Zhang, B., Zhang, J. (2002). Micronuclei induced by sulfur dioxide inhalation in mouse bone-marrow cells in vivo. *Inhal Toxicol*, 14: 303–9.
19. Olcay, A. (1998). *Kimyasal Teknolojiler*. Ankara: Gazi Kitabevi.
20. Erişim: 05 Mayıs 2011
<http://www.renkliweb.com/kultursanat/so2-bilesigi-hangi-elementlerden-olusur-ozellikleri-nelerdir.html>
21. Özdemir, F. (2008). Türkiye Genelinde Kükürt dioksit ve Partiküler Madde Kirlili Dağılımlarının Analizi. Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul.
22. Özdemir, H.İbrahim (1981). *Genel Anorganik ve Teknik Kimya*. İstanbul: Teknik Kitaplar Yayınevi.
23. Erişim: 10 Nisan 2011 <http://www.renkliweb.com/kultursanat/so2-bilesigi-hangi-elementlerden-olusur-ozellikleri-nelerdir.html#ixzz1GTpy4eIS>
24. Erişim:10 Nisan 2011
http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_content&view=article&id=4389&Itemid=389

25. Gültek, A. (1996). Kayısının Kükürtlenmesinde Bazı parametrelerin İncelenmesi ve Kayısındaki Aşırı kükürdün H₂O₂ Yöntemiyle Giderilmesi. Doktora Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
26. Göğüs, AK. (1994). Kayısı ve kayısı mamulleri standardları ile ilgili görüşler. *Standard Kayısı Özel Sayısı*, 86–96.
27. Nurhan, K. (1999). Kayısı Kükürtlemede Çalışan İşçilerde Kükürt dioksit Gazının Solunum Sistemi Üzerine Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
28. Eğri, M., Güneş, G., Pehlivan, E., Genç, M. (1997). Son 5 Yıllık Dönemde Malatya İl Merkezinde Hava Kirliliği Eğiliminin İncelenmesi. *Turgut Özal Tıp*, 4: 375–379.
29. Erişim: 10 Nisan 2011 <http://www.mozturk.net/Yazdir.asp?Id=680>
30. Weiss, SM., Lakshminarayan, S. (1994). Acute inhalation injuries. *Clin Chest Med* 15: 103–115.
31. Rorison, DG., McPherson, SJ. (1992). Acute toxic inhalations. *Emerg Med Clin North Am*, 10: 409–435.
32. Samet, JM., Utell, MJ. (1998). Indoor and outdoor air pollution. In: Fishman, AP., Elias, JA., Fishman, JA., Grippi, MA., Kaiser, LR., Senior, RM. *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 3rd Ed. McGraw-Hill*, New York, 941–963.
33. Canan, A. (2005). Kayısı İslimlemesinde Açığa Çıkan Sülfür dioksit Gazına Maruz Bırakılan Sıçanlarda Serebral Oksidatif Hasara Ginkgo Bilobanın Etkisi. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
34. Nemery, B., Hoet, PHM., Nemmar, A. (2001). The Meuse valley fog of 1930 an air pollution diasaster. *Lancet*, 357: 704-8.
35. Helfand, WH., Lazarus, J., Theerman, P. (2001). Donara, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am J. Public Health*, 91(4): 553.
36. Jeffery, P. Kaplan. *Toxicological Profile For Sulfur Dioxide*. Atlanta, Georgia: 3–128.
37. Fraser, PS., Pare, JAB., Fraser RG., Pare, PD. (1994). Pulmonary diseases caused by drugs, oisons and inhaled toxic eases and aerosols. 753–80.

38. Borska, L., Fiala, Z., Sedlacek, J., Visnousky, P. (1998). Effect of acute exposure to SO₂ on cellular defense mechanisms in the lung. *Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl*, 41(1):23–26.
39. Sandström, T., Stjernberg, N., Andersen, M.C., Kalmödin-Hedman, B., Lundgren R., Angström T: (1989). Is the short term limit value for sulphur dioxide exposure safe. Effects of controlled chamber exposure investigated with bronchoalveolar lavage. *Br. J. Industrial Med*, 46: 200–203.
40. Jakab, G.J., Clarke, R.W., Hemenway, D.R., Longphre, M.V., Kleeberger, S.R., Frank, R. (1996). Inhalation of acid coated carbon black particles impairs alveolar macrophage phagocytosis. *Toxicology Letters*, 88: 243–248.
41. Mazumdar, S., Sussman, N. (1983). Relationships of air pollution to health results from the Pittsburg study. *Arch. Environ. Health*, 38 (1): 17–24.
42. Gold, DR., Litonjua, A., Schwartz, J., Lovett, E., Larson, A., Nearing, B., Allen, G., Verrier, M., Cherr, R., Verrier, R. (2000). Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation*, 101:1267-1273a.
43. Yun-Chul, Hong., MD, Ph D., Jong-Tae, Lee., Ph D., Ho-Jang Kwon, MD, PhD. (2002). Air Pollution A New Factor in Ischemic stroke mortality. *Stroke*, 33: 2165-2169.
44. Ünalı, C. (1994). Kayısının Türkiye-Malatya Ekonomisindeki Yeri Ve Önemi. *Standard Kayısı Özel Sayısı*, 75–79.
45. Ural, A. (1995). Kayısının Besin Değeri Ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi. Malatya 3. Kayısı Fuarı, 5. Kayısı Paneli. Malatya: 7–27.
46. Tarlo, S. M., Broder. 1. Corey, P., Chan-Yeung, M., Ferguson. A, Becker A., Rogers, C., Okada, M., and Manfreda, J. (2001). The role of symptomatic colds asthma exacerbations: Influence of outdoor allergens and air pollutants. *J. Allergy Clin. Immunol*, 108:52-58.
47. Wang, X., Ding, IL, Ryan, L., Xu, X. (1997). Association between air pollution and low birth weight. A community-based study. *Environ. Health Perspect*, 105: 514-520.
48. Wong, TW., Lau, TS., Yu, TS., Neler, A., Wong, SL., Tarn, W., Pang, SW. (1999). Air pollution and hospital admissions for respiratory and cardiovascular diseases in Hong Kong *Occup. Med*, 56: 679-683.

49. Hernández, LG., van Steeg, H., Luijten, M., van Benthem, J. (2009). Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands*, 682 (2–3): 94–109.
50. Meng, Z., Zhang, B. (1999). Polimorase chain reaction based deletion screening of bisulfate (sulfur dioxide)-enhanced gpt-mutans in CHO-AS52 cells. *Mutat. Res*, 425: 81-85.
51. Meng, Z., Zhang, B., Ruan, A., Sang, N., Zhang J. (2002). Micronuclei induced by sulfur dioxide inhalation in Mouse bone-marrow cells in vivo. *Inhal Toxicol*, 14: 303-309.
52. Gezer, İ. (2005). Kayııcılıkta Mekanizasyon. Malatya: Matbaacılık Yayıncılık.
53. Asma, B.M., Gültek, A., Kan, T., Birhanlı, O. (2005). Kayııda Kükürt sorunu. Malatya: Öz Gayret Ofset.
54. Çamlıbel, ML. (1994). Kuru kayısı ihracatımız. *Standard Kayısı Özel Sayısı*, 80–85.
55. Pala, M., Saygı, YB. (1994). Kayııda Teknolojik Sorunlar Ve Çözüm Yolları. *Standard Kayısı özel sayısı*, 70–74.
56. Anonim. (2005). Dış Ticaret Müsteşarlığı, DTS Grup Başkanlığı, Malatya.
57. Yıldız, F. (1994). Kayısı işlemede yeni teknolojiler (alternatif kayısı mamulleri). *Standard Kayısı özel sayısı*, 67–69.
58. Nakanishi, Y., Schneider, E.L. (1979). In vivo sister-chromatid exchange: a sensitive measure of DNA damage. *Mutat Res*. 60(3): 329-37.
59. Kadyk, L., Hartwell, L. (1992). Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 132 (2): 387-402.
60. Sasaki, MS. (1980). Chromosome aberration formation and sister chromatid exchange in relation to DNA repair in human cells. *Basic Life Sci* 15: 285-313.
61. Latt, S.A., Schreck, R.R. (1980). Sister Chromatid Exchange Analysis. *Am J Hum Genet*, 32: 297-313.

62. Gadhia, P.K., Vaniawala, S., Pithawala, M. (2005). Some Observations on Spontaneous Sister Chromatid Exchange Frequencies and Cell Cycle Progression in Stimulated Lymphocytes of Patients With Different Malignancies. *Int J Hum Genet*, 5(3): 187-191
63. Wilson, D.M., Thompson L.H. (2007). Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutat Res.* 1;616(1 -2):11 -23.
64. Taylor, J.H., Woods, R.S., Hughes, W.L. (1957). The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labelled thymidine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 43:122-127.
65. Gerster, J.L. (1988). A Cytogenetic Study of Factors Affecting Sister Chromatid Differentiation in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. Master of Science, McGill University Montreal.
66. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. (2010). *Sitogenetik* (2.bs). Ankara: Nobel Yayın Dağıtım.
67. Atmaca, M. (2002). Çırçır Fabrikası İşçilerinde Kardeş Kromatid Değişimi. Yüksek Lisans Tezi. Pamukkale Üniversitesi. Denizli.
68. Ocak, T. (2008). Karbon Monoksitle Zehirlenme Olgularının Lenfosit Hücrelerinde Kardeş Kromatid Değişimi Sıklığının Belirlenmesi. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi, Erzurum.
69. Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del R.S., Andreassi, M.G., Ballardini, M., Bulled, M., He, J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F., Landi, S. (1998). Sister chromatid Exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environ Mol Mutagen*, 31: 228-242.
70. Krishnaja, A.P., Sharma, N.K. (2003). Ascorbic acid potentiates mitomycin c-induced micronuclei and sister chromatid exchanges in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis Supplement*, 1: 99-112.
71. Surrallas, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H., Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated lymphocyte cultures. *Mutation Research*; 341: 169-184.

72. Evans, H.J. (1983). Cytogenetic methods for detection effects of chemical mutagens. *Annals New York Academy of Sciences*; 83: 131-140.
73. Gulten, T., Tokyay, N., Demiray, M., Gulten, M., Ercan, I., Evke, E., Sardas, S., Karakaya, A.E. (2002). The role of triple therapy, age, gender and smoking on the genotoxic effects of *Helicobacter pylori* infection. *JInt Med Res*, 30: 380-385.
74. Slapsite, G., Jankauskiene, A., Mierauskiene, J., Lazutka, J.R. (2000). Cytogenetic analysis of children under long-term antibacterial therapy with nitroheterocyclic compound furagin. *Mutation Research*, 2000; 491: 25-30.
75. Lazutka, J.R. (1991). Replication index in cultured human lymphocytes: methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ Mo! Mutagen*. 17(3):188-95.
76. Krishna G., Nath J., Ong T. (1986). Inhibition of Cyclophosphamide and Mitomycin C-induced Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C. *Cancer Research*. 46, 2670–2674.
77. Alves, P., Jonasson, J. (1978). New Staining Method For The detection of Sister-Chromatid Exchanges in BrdU-Labelled Chromosomes *J. CM Set*. 33, 185–195.
78. Natarajan, A.T. (2002). Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504: 3-16.
79. Shaffer, L.G., Slovak, M., Campbell, L.J. (2009). *International system for human cytogenetic nomenclature*. Cytogenetics and Genome Research, Karger.
80. Kasap, H., Kasap, M., Demirhan, O., Alptekin, D., Lüleyap, Ü., Pazarbaşı, A., Güzel, I.A. (2009). *Tıbbi Biyoloji ve Genetik*. Adana: Nobel Kitabevi.
81. Rooney, D. E.(Ed), (2001). *Human Cytogenetics constitutional analysis*. Third Edition, Oxford University Press.
82. Başaran, N., (1999). *Tıbbi Genetik*. İstanbul: Güneş-Nobel Tıp Kitabevi.
83. Countryman, P.I, Heddle, J.A. (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res*. 41(2-3): 321-32.

84. Slowinski, J., Bierzynska-Macyszyn, G., Mazurek, U., Widel, M., Stomal, M., Snietura, M., Mrowka, R. (2004). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Glioma Cells Exposed to Radiation. *Image anal stereol*, 23: 159–65.
85. Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemmmki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, İL, Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000). IPCS Guidelines for the Monitoring of Genotoxic Effects of Carcinogens in Humans. *Mutation Research*, 463: 111- 172.
86. Kirsch-Volders, M. (1997). Towards a Validation of The Micronucleus Test. *Mutation Research*, 392:1–4.
87. Yıldırım, İ.H. (2004). Bazı Kanser Hastalarında Mikronükleus Sıklığının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
88. Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. *Nature Protocols*, 1084- 1104.
89. Lüleci G., Sakızlı M. (Ed). (2009). *Renkli Genetik Atlası*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
90. Speit, G., Häupter, S., (1985). On the Mechanism of Differential Giemsa Staining of Bromodeoxyuridine Substituted Chromosomes. II. Differences Between the Demonstration of Sister Chromatid Differentiation and Replication Patterns. *Hum. Genet.*, 70, 126–129.
91. Rothfuss, A., Schutz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhardt, E., Kreienberg, R., Vogel, W., Speit, G., (2000). Induced Micronucleus Frequencies in Peripheral Lymphocytes as a Screening Test for Carriers of a *BRCA1* Mutation in Breast Cancer Families. *Cancer Research*, 60: 390-394.
92. Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch, M., Holland, H., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534, 65-75.
93. Lee, WJ., Teschke, K., Kauppinen, T., Andersen, A., Jäppinen, P., Szadkowska-Stanczyk, I., Pearce, N., Persson, B., Bergeret, A., Facchini, LA., Kishi, R., Kielkowski, D., Rix, BA., Henneberger, P., Sunyer, J., Colin, D., Kogevinas, M., Boffetta, P. (2002). Mortality from lung cancer in workers

- exposed to sulfur dioxide in the pulp and paper industry. *Environ Health Perspect*, 110 (10): 991–5.
94. Ermis, H., Gokırmak, M., Yildırım, Z., Yologlu, S., Ankaralı H. (2010). Exposure to SO₂ does not have a chronic effect on pulmonary functions of apricot workers. *Inhal Toxicol*, 22 (3): 219–23.
 95. Katanoda, K., Sobue, T., Satoh, H., Tajima, K., Suzuki, T., Nakatsuka, H., Takezaki, T., Nakayama, T., Nitta, H., Tanabe, K., Tominaga, S. (2011). An association between long-term exposure to ambient air pollution and mortality from lung cancer and respiratory diseases in Japan. *J Epidemiol*, 5;21(2):132–43.
 96. Yildirim, Z., Kilic, T., Koksall, N., Kotuk, M. (2005). Protective effect of ipratropium bromide on bronchoconstriction induced by sulfur dioxide exposure during apricot sulfurization processes that causes asthma-like syndrome in agricultural environment. *Pharmacol Res*, 51(5):479–82.
 97. Meng Z, Liu Y.(2007). Cell morphological ultrastructural changes in various organs from mice exposed by inhalation to sulfur dioxide. *Inhal Toxicol*, 19(6–7):543–51.
 98. Henderson, L., Jones, E., Brooks, T., Chetelat, A., Ciliutti, P., Freemantle, M., Howard, C.A., Mackay, J., Phillips, B., Riley, S., Roberts, C, Wotton, A.K., Waart, E.J. (1997). Industrial Genotoxicology Group collaborative trial to investigate cell cycle parameters in human lymphocyte cytogenetics studies. *Mutagenesis vol*, 12(3):163-167.
 99. Lakshmi Sowjanya, B., Rudrama Devi K., Madhavi D. (2009). Modulatory effects of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes *in vitro*. *Journal of Environmental Biology*, 30(5):663-666.
 100. Wilmer, J.L., Erexson, G.L., Kligerman, A.D. (1990). Effect of Acrolein on Phosphoramidate Mustard-induced Sister Chromatid Exchanges in Cultured Human Lymphocytes. *Cancer Research*, 50, 4635-4638.
 101. Sang, N., Hou, L., Yun Y, Li G. (2009). SO₂ inhalation induces protein oxidation, DNA-protein crosslinks and apoptosis in rat hippocampus. *Ecotoxicol Environ Saf*, 72(3):879–84.

102. Yun Y, Hou L, Sang N. (2011). SO₂ inhalation modulates the expression of pro-inflammatory and pro-apoptotic genes in rat heart and lung. *J Hazard Mater*, 15;185(1):482–8.
103. Gokirmak, M., Yildirim, Z., Canan Hasanoglu, H., Koksall, N., Mehmet, N. (2003). The role of oxidative stress in bronchoconstriction due to occupational sulfur dioxide exposure. *Clin Chim Acta*, 331(1–2):119–26.
104. Fimognari, C., Lenzi, M., Hrelia, P. (2009). Apoptosis induction by sulfur-containing compounds in malignant and nonmalignant human cells. *Environ Mol Mutagen*, 50(3):171–89.
105. Meng, Z., Qin, G., Zhang, B., Bai, J. (2004). DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis*, 19(6):465–8.
106. Summers, GA., Drake, JW. (1971). Bisulfite mutagenesis in bacteriophage T4. *Genetics*, 68(4):603–7.
107. Bai, J., Meng, Z. (2010). Effect of sulfur dioxide on expression of proto-oncogenes and tumor suppressor genes from rats. *Environ Toxicol*, 25(3):272–83.
108. Qin, G., Meng, Z. (2010). Sulfur dioxide and benzo(a)pyrene modulates CYP1A and tumor-related gene expression in rat liver. *Environ Toxicol*, 25(2):169–79.
109. Xie J., Li, R., Fan, R., Meng, Z. (2009). Effects of sulfur dioxide on expressions of p53, bax and bcl-2 in lungs of asthmatic rats. *Inhal Toxicol*, 21(11): 952–7.

ÖZGEÇMİŞ

Gaziantep’te doğdum. 2007 yılında İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümünden ikincilikle mezun oldum. 2008 yılında İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım. 2011 yılında İnönü Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandım, halen görevime devam etmekteyim.