



**T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERKLORETİLENİN İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ MUHTEMEL  
GENOTOKSİK POTANSİYELİ ÜZERİNE E VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

**KÜBRA ASFUROĞLU**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**HATAY  
TEMMUZ-2019**



T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERKLORETİLENİN İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ MUHTEMEL  
GENOTOKSİK POTANSİYELİ ÜZERİNE E VİTAMİNİNİN ETKİSİ

KÜBRA ASFUROĞLU

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY  
TEMMUZ-2019

T.C.  
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERKLORETİLENİN İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ MUHTEMEL  
GENOTOKSİK POTANSİYELİ ÜZERİNE E VİTAMİNİNİN ETKİSİ**

**Kübra ASFUROĞLU**  
**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANSTEZİ**

**Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN**'ın danışmanlığında hazırlanan bu tez 05/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN  
Başkan

Prof. Dr. Songül BUDAK DİLER  
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hasan YILDIZ  
Üye

**Kod No:**

**Prof. Dr. Erdal SERTKAYA**  
**Enstitü Müdürü**

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 18.YL.011

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

05.07.2019

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

**Kübra ASFUROĞLU**

## ÖZET

### PERKLORETİLENİN İNSAN LENFOSİTLERİNDEKİ MUHTEMEL GENOTOKSİK POTANSİYELİ ÜZERİNE E VİTAMİNİNİN ETKİSİ

Perkloretilen (tetrakloretilen, PCE), kuru temizleme endüstrisinde yaygın olarak kullanılan klorlu bir çözücüdür. Bu çalışma, PCE'nin potansiyel genotoksik aktivitesini ve PCE tarafından indüklenen DNA hasarına karşı bir antioksidan ajan olan E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)'nin olası koruyucu etkisini insan periferel kan lenfositlerinde *in vitro* kromozom anormalliği (KA) ve sitokinez-bloklama mikronükleus (MN) testleri kullanarak araştırmak için yapılmıştır. Bu amaçla, lenfositler, 25, 50, 100 ve 150  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlardaki PCE ile hem tek başına hem de E vitamini (100  $\mu\text{g/ml}$ ) ile kombinasyon halinde 48 saat süre ile muamele edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçları, PCE'nin kontrolle karşılaştırıldığında tüm konsantrasyonlarda yapısal KA ve MN oluşumunu önemli ölçüde indüklediğini göstermiştir. Bununla birlikte, PCE'nin neden olduğu bu genetik hasar, kültürlere E vitamininin ilave edilmesiyle önemli derecede azalmıştır. Hücre döngüsü kinetiği ile ilgili olarak, PCE, mitotik indekste (MI) ve ayrıca nükleer bölünme indeksinde (NBI) kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmuştur. Bununla birlikte, E vitamini, MI ve NBI'deki bu azalmayı etkilememiştir.

Sonuç olarak, test edilen deney koşullarında elde edilen mevcut sonuçlar, PCE'nin genotoksik olduğunu ve E vitamininin PCE tarafından indüklenen genotoksisiteyi önleyebileceğini ancak PCE'nin indüklediği sitotoksisiteyi etkilemediğini göstermektedir.

2019, 83 Sayfa

**Anahtar kelimeler:** Perkloretilen; E vitamini; kromozom anormalliği; mikronükleus

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF VITAMIN E ON POSSIBLE GENOTOXIC POTENTIAL OF PERCHLOROETHYLENE IN HUMAN LYMPHOCYTES

Perchloroethylene (tetrachloroethylene, PCE) is a chlorinated solvent which widespread use in the dry cleaning industry. This study was undertaken to investigate the potential genotoxic activity of PCE and also the possible protective effect of Vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol), an antioxidant agent, against PCE-induced DNA damage using *in vitro* chromosome aberrations (CAs) and cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assays in human peripheral blood lymphocytes. For this aim, lymphocytes were treated with 25, 50, 100, and 150  $\mu\text{g/ml}$  PCE alone as well as in combination with vitamin E (100  $\mu\text{g/ml}$ ) for 48 h treatment periods.

The results of this study showed that PCE significantly induced the formation of structural CA and MN for all concentrations when compared with the control. However, this genetic damage, caused by PCE, was significantly decreased by co-treatment of vitamin E in the cultures. With regard to the cell cycle kinetics, PCE caused a statistically significant reduction in the mitotic index (MI) and also in the nuclear division index (NDI) as compared to the control. Nevertheless, vitamin E did not affect this reduction in the MI and NDI.

In conclusion, the present results demonstrate that in the tested experimental conditions, PCE is genotoxic, and vitamin E can prevent the genotoxicity induced by PCE but it has no effect on PCE-induced cytotoxicity.

2019, 83 Pages

**Key words:** Perchloroethylene; vitamin E; chromosome aberrations; micronucleus

## TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın her aőamasında; konunun seçiminden araştırmanın yürütölmesi, laboratuvar çalışmalarının yapılması ve tezimin yazımına kadar her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren değerli danıőman Hocam Prof. Dr. Ayşe YAVUZ KOCAMAN'a (Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Fen Edebiyat Faköltesi, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi) ok teşekkür ederim.

Tezde kullanılan fotoğrafların çekimi sırasındaki teknik yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Selahattin KOCAMAN'a (İskenderun Teknik Üniversitesi, Mühendislik Faköltesi, İnőaat Mühendisliği Bölümü öğretim üyesi), tez çalıőmamı maddi yönden destekleyen Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi yöneticilerine teşekkür ederim.

Ayrıca Yüksek Lisans eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen bu günlere gelmemi sağlayan sevgili aileme teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	I
ABSTRACT .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	IX
1. GİRİŞ .....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR .....	10
2.1. Perkloretilen (PCE) ile Yapılan Genotoksisite Çalışmalar .....	10
2.2. E Vitamini ( $\alpha$ -Tokoferol)'nin Koruyucu Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar .....	14
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	17
3.1. Materyal .....	17
3.1.1. Deney Materyali .....	17
3.1.2. Test Edilen Maddeler .....	17
3.1.2.1. Perkloretilen (PCE) .....	17
3.1.2.2. $\alpha$ -Tokoferol .....	18
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	19
3.1.4. Hipotonik Çözelti .....	19
3.1.5. Fiksatif .....	20
3.1.6. Sorenson Tamponu .....	20
3.1.7. Nitrik Asit Çözeltisi .....	20
3.2. Yöntem .....	20
3.2.1. Kromozom Anormalliği (KA) Testi .....	20
3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması .....	20
3.2.2. Sitokinez-Bloklama Mikronukleus (MN) Testi .....	22
3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması .....	22
3.2.3. Kromozom Anormalliği ve Mikronukleus Analizleri için Preparatların Boyanması .....	23
3.2.4. Mikroskopik İnceleme .....	23
3.2.4.1. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması .....	23
3.2.4.2. Mikronukleus Sayısı ve Nukleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması .....	24
3.2.4.3. Redüksiyon Yüzdesi .....	28
3.2.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekimi .....	28
3.2.6. İstatiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi .....	28
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	30
4.1. Bulgular .....	30
4.1.1. PCE ve PCE + $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositleri Üzerindeki Etkileri .....	30
4.1.1.1. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....	30
4.1.1.2. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....	43



4.1.1.3. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Mitotik indeks (MI) Üzerine Etkileri.....	51
4.1.1.4. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Üzerine Etkileri .....	54
4.2. Tartışma .....	55
4.2.1. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormalliği (KA) ve Mikronukleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri .....	55
4.2.2. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Mitotik İndeks (MI) ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Üzerine Etkileri .....	65
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	68
KAYNAKLAR .....	70
ÖZGEÇMİŞ .....	83



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Perkloretilenin yapısal formülü .....	18
Şekil 3.2.	$\alpha$ -Tokoferolün yapısal formülü .....	19
Şekil 3.3.	Bir nükleuslu hücre (X1000) .....	26
Şekil 3.4.	İki nükleuslu hücre (X1000) .....	26
Şekil 3.5.	Üç nükleuslu hücre (X1000) .....	27
Şekil 3.6.	Dört nükleuslu hücre (X1000) .....	27
Şekil 4.1.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde yapısal KA taşıyan hücre yüzdesi. ....	33
Şekil 4.2.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde yapısal KA taşıyan hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı .....	33
Şekil 4.3.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Toplam KA/Hücre oranı .....	34
Şekil 4.4.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Toplam KA/Hücre frekansının konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. ....	34
Şekil 4.5.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (25 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000 .....	35
Şekil 4.6.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000 .....	35
Şekil 4.7.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (50 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000 .....	36
Şekil 4.8.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (25 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000 .....	36
Şekil 4.9.	Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (50 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000 .....	37
Şekil 4.10.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (50 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000 .....	37
Şekil 4.11.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000 .....	38
Şekil 4.12.	Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000 .....	38
Şekil 4.13.	(a) Kromatid kırığı (B'), (b) kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (150 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000 .....	39
Şekil 4.14.	Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000 .....	39
Şekil 4.15.	(a) Kromatid kırığı (B'), (b) kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı.(100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀ ). X1000 .....	40
Şekil 4.16.	Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀ ). X1000 .....	40
Şekil 4.17.	Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀ ). X1000 .....	41
Şekil 4.18.	Fragment (F) bulunan metafaz plağı (100 $\mu$ g/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000 .....	41

Şekil 4.19.	Fragment (F) bulunan metafaz plağı (150 µg/ml perkloretilen,48 saat uygulama, ♂ ). X1000 .....	42
Şekil 4.20.	Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (150 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000.....	42
Şekil 4.21.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesi.....	45
Şekil 4.22.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	45
Şekil 4.23.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN %'si.....	46
Şekil 4.24.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN içeren hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	46
Şekil 4.25.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (25 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000 .....	47
Şekil 4.26.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀ ). X1000 .....	47
Şekil 4.27.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml perkloretilen +100 µg/ml α-tokoferol, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000.....	48
Şekil 4.28.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀ ). X1000 .....	48
Şekil 4.29.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000 .....	49
Şekil 4.30.	Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml perkloretilen+100 µg/ml α-tokoferol, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000.....	49
Şekil 4.31.	İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂ ). X1000.....	50
Şekil 4.32.	İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (150 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀ ). X1000.....	50
Şekil 4.33.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks.....	53
Şekil 4.34.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı.....	53
Şekil 4.35.	Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde NBI.....	55

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Perkloretilenin kimyasal ve fiziksel özellikleri (USEPA, 2012).....	17
Çizelge 4.1.	PCE ve PCE+ $\alpha$ - tokoferol uygulamasının insan periferal lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi.....	32
Çizelge 4.2.	PCE ve PCE+ $\alpha$ - tokoferol uygulamasının insan periferal lenfositlerinde mikronükleus oluşumu üzerine etkisi.....	44
Çizelge 4.3.	PCE ve PCE+ $\alpha$ - tokoferol uygulamasının insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI) üzerine etkileri .....	52



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
$\gamma$	: Gama
$\delta$	: Delta
B'	: Kromatid Kırığı
B''	: Kromozom Kırığı
F	: Fragment
N	: Toplam hücre sayısı
P	: İstatistiksel olarak önemlilik derecesi
n	: Kromozom sayısı
r	: Regresyon

### KISALTMALAR

BN	: Binükleat hücre
Bw	: Body Weight (Vücut Ağırlığı)
Cat.No.	: Katalog Numarası
CHL	: Çin Hamsteri Akciğer Hücresi
CHO	: Çin Hamsteri Ovaryum Hücresi
ÇK	: Çözücü Kontrol
DNA	: De(z)oksiribonükleik asit
DS	: Disentrik Kromozom
EtOH	: Etil Alkol
HNO <sub>3</sub>	: Nitrik Asit
IARC	: International Agency for Research on Cancer (Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu)
i.p	: İntraperitoneal
KA	: Kromozomal Anormallik

KCl	: Potasyum Klorür
KKB	: Kardeş Kromatid Birleşmesi
KKD	: Kardeş Kromatid Değişmesi
mg/kg	: Miligram/kilogram
mg/l	: Miligram/litre
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
ml	: Mililitre
MI	: Mitotik İndeks
mM	: Milimolar
MMC	: Mitomycin C
MN	: Mikronükleus
MNBN	: Mikronükleuslu binükleer hücre
MN/hücre	: Hücre başına düşen mikronükleus sayısı
MI	: Bir nükleuslu hücre
MII	: İki nükleuslu hücre
MIII	: Üç nükleuslu hücre
MIV	: Dört nükleuslu hücre
NaCl	: Sodyum Klorür
NBI	: Nükleus Bölünme İndeksi
ng/ml	: Nonogram/mililitre
PCE	: Perkloretillen
PI	: Proliferatif İndeks
RNA	: Ribonükleik asit
Rpm	: Bir dakika içerisinde gerçekleşen dönüş/devir sayısı
SOD	: Süperoksit Dismutaz
TCA	: Triklorasetik asit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organisation)

## 1. GİRİŞ

Perkloretilen, (PCE, PERC, tetrakloretilen, tetrakloroeten, perklor) uçucu, klorlanmış bir organik hidrokarbondur. Bu madde, yanıcı olmayan, renksiz bir sıvı şeklinde olup lipofilik özelliğe sahiptir (ATSDR, 2014). PCE, günümüzde kuru temizleme ve tekstil işleme endüstrisinde bir çözücü; metal parçaların yağdan arındırılması için bir ajan ve florokarbonların sentezi için bir kimyasal ön madde olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (ATSDR, 1997; IARC, 2014; NTP, 2016). PCE, ayrıca elektrik transformatörlerinde bir yalıtım sıvısı ve soğutma gazı olarak; boya sökücüler, baskı mürekkepleri, yapıştırıcılar, kağıt kaplamalar ve deri işlemlerinde; su iticiler, otomotiv temizleyicileri, silikon yağlayıcıları ve leke çıkarıcılar gibi aerosol formülasyonlarda; farmasötikler için bir özütleyici olarak; endüstriyel kazanlardan islekelerini çıkarmada ve bir antihelmintik ajan olarak da kullanılmaktadır (IARC, 1995; NTP, 2016).

PCE, üretildiği veya kullanıldığı yerlerden hava, su ve toprağa salınabilir. Kimyasal atıklarda yaygın olarak bulunur, kolaylıkla buharlaşabilir, atmosferde yayılabilir ve içme suyuna sızabilir (ATSDR, 2014). Yapılan çalışmalarda, PCE'nin yeraltı suyu, yüzey suları ve toprakta yaygın bir şekilde kirletici olarak bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle, insanlar PCE'ye hem mesleki hem de çevresel yolla maruz kalmaktadırlar (ATSDR, 2014). PCE uçucu ve lipofilik özelliğe sahip olduğundan solunum ve oral maruziyetten sonra hızla ve yoğun bir şekilde emilir. Aynı zamanda cilt yoluyla da hızla emilebilir (Stewart ve Dodd, 1964), ancak dermal emilim, daha az önemli bir maruz kalma yolu gibi görünmektedir (NRC, 2010).

Kuru temizleme tesisleri atmosfere salınan PCE için önemli bir kaynaktır (NRC, 2010). Uluslararası kuru temizleme yönetmelikleri kuru temizleme merkezlerinin aylık PCE tüketim kayıtlarını düzenli olarak yaptırmalarını zorunlu kılmaktadır. Ayrıca gelişmiş ülkelerde kuru temizleme merkezlerinde çalışan işçilerin yıllık düzenli sağlık kontrolünden geçmeleri de zorunludur. Fakat ülkemizde böyle bir uygulama henüz yapılmamaktadır. Üstelik bu merkezlerde çalışan işçiler PCE ve diğer kimyasal maddeleri bilinçsizce kullanmaktadır. Bunların yanında, kuru temizleme sonrasında oluşacak kimyasal atıkların doğaya ve insan sağlığına zarar vermeyecek şekilde uzaklaştırılması sağlanmalıdır. Çünkü, böyle bir çevrede yaşayan insanların da bu kimyasal maddelerden zarar görmesi kaçınılmaz olacaktır.

Uluslararası Kanser Araştırma Kurumu (IARC; International Agency for Research on Cancer)'na göre PCE insanlar için muhtemel kanserojen madde grubuna (Grup 2A) girmektedir (IARC, 1995; 2014). Ayrıca Ulusal Toksikoloji programı (NTP; National Toxicology Program) tarafından da PCE'nin insanlar için muhtemel kanserojen bir madde olduğu bildirilmiştir (NTP, 2016).

Amerika ve Avrupa Birliği ülkelerinin birçoğunda PCE'nin muhtemel kanserojenik etkisi nedeniyle kuru temizleme merkezlerindeki kullanımına sınırlamalar ve kurallar getirilmiştir. Bu ülkelerde, PCE'nin 1970'lerdeki kullanım oranları; kuru temizleme ve tekstil işleme için % 58, metal temizleme için % 18, kimyasal ara ürünler için % 12 ve diğer tüm kullanımlar için % 12 şeklinde iken (IARC, 1995; NTP, 2016); 1990'lı yıllarda kuru temizleme endüstrisindeki PCE kullanımı, işyerinde bu maddeye maruz kalmayla ilgili katı resmi düzenlemelere uyulmasıyla düşüş göstermiştir. 2002 yılına kadar kullanım oranları, kuru temizleme için % 15, metal temizleme için % 10, kimyasal ara maddeler için % 65 ve diğer kullanımlar için % 10 şeklinde olmuştur (NTP, 2016). Görüldüğü gibi, gelişmiş ülkelerde ve özellikle Avrupa Birliği ülkelerinde PCE'nin kuru temizleme tesislerindeki kullanımına ciddi kısıtlamalar ve kurallar getirilirken ülkemizdeki kullanımı ise hiçbir şekilde denetlenmemekte ve yaygın bir şekilde kullanılmaya devam etmektedir (Anonim, 2018).

PCE'nin kanserojenik etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır. PCE vücuda girdiğinde ilk olarak triklorasetik asite (TCA) metabolize edilir. TCA'nın farelerde hepatokanserojen (karaciğer hücrelerinde kansere neden olan) olduğu belirlenmiştir (Bull ve ark., 1990; DeAngelo ve ark., 2008). Sweeney ve ark. (2009) tarafından, solunum yoluyla PCE'ye maruz kalan farelerde karaciğerde kanser oluşum riskinin arttığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise PCE'nin sıçanlarda böbrek tümörlerinin oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (Green ve ark., 1990). Mesleki olarak PCE çözücüsüne maruz kalmanın insanlarda böbrek kanseri riskini önemli derecede arttırdığı bildirilmiştir (Ma ve ark., 2009; Mandel ve ark., 1995).

Mesleki olarak PCE'ye maruz kalan 10 kuru temizleme çalışanın lenfositlerinde kontrole göre kromozom anormalliği (KA) ve kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansında önemli bir artış gözlenmemiştir (Ikeda ve ark., 1980). Seiji ve ark. (1990) tarafından, PCE'ye maruz kalan 27 işçi ile yapılan çalışmada KKD frekansının kontrole göre artmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, PCE'ye maruz kalan 18 bayan kuru



temizleme işçisiyle yapılan çalışmada; kuru temizleme çalışanlarının periferik lenfositlerinde gözlenen translokasyon, insersiyon, disentrik kromozom ve asentrik fragment gibi kromozomal anormalliklerin kontrole göre arttığı fakat bu artışların istatistiksel olarak önemli olmadığı bildirilmiştir (Tucker ve ark., 2011).

PCE'nin muhtemel mutajenik ve genotoksik etkisini araştıran *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar da mevcuttur. Bununla birlikte, her ne kadar PCE'nin genotoksitesitesi ile ilgili birçok çalışma yapılmışsa da bu maddenin muhtemel mutajenik etkisi halen tartışmalıdır. Callen ve ark. (1980) tarafından *Saccharomyces cerevisia* mayasının diploid D7 ırkında, PCE'nin mitotik gen dönüşümü ve rekombinasyonuna neden olduğu; fakat Bronzetti ve ark.(1983) ve Koch ve ark. (1988) tarafından yapılan çalışmalarda ise benzer etkinin gözlenmediği bildirilmiştir. Valencia ve ark. (1985) yaptıkları çalışmada da PCE'nin *Drosophila melanogaster*'de eşeye bağlı resesif letal mutasyon testinde negatif sonuçlara neden olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, PCE'nin, L5178Y / TK +/- fare lenfoma hücrelerinde (F344 sıçan karaciğeri) timidin kinaz lokusunun mutasyon frekansını hem S9 aktivasyonu varlığında ve hem de yokluğunda arttırmadığı bildirilmiştir (NTP, 1986). Genel olarak, PCE'ye maruz bırakılan *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* hücrelerinde S9 metabolik aktivasyonu varlığında ve yokluğunda mutasyon gözlenmediği bildirilmiştir (IARC, 2014).

PCE'ye *in vitro* olarak maruz bırakılan Çin hamsteri yumurta hücrelerinde ne kromozomal anormallikler ne de KKD frekansında artışın olduğu bildirilmiştir (Sofuni ve ark., 1985; Galloway ve ark., 1987). Ayrıca, PCE'nin kültüre alınmış insan kan hücrelerinde sitotoksiteye bağlı olarak canlılığı % 40 düşüren doz olan 5 mM (~ 830 mg/l) kadar olan konsantrasyonda KKD veya tek hücreli jel test (komet) testlerinde DNA hasarını arttırmadığı bulunmuştur (Hartmann ve Speit, 1995).

Murakami ve Horikawa (1995) tarafından yapılan *in vivo* çalışmada, PCE'nin ddY farelerinin hepatositlerinde mikronükleus (MN) frekansında artışa neden olduğu fakat farelerin periferik kan retikülositlerinde benzer artışın gözlenmediği bildirilmiştir. PCE (125–250 µg/ml) ile muamele edilen Çin hamsteri akciğer hücre hattında (CHL/IU) MN oluşumunu indüklediği bildirilmiştir (Matsushima ve ark., 1999).

Bununla birlikte, Wang ve ark. (2001), PCE'ye *in vitro* maruz bırakılan (24 saat) Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde (CHO-K1), MN frekansında doza bağlı önemli bir

artıŖa neden olduğunu bildirmişlerdir (Wang ve ark., 2001). Benzer şekilde, PCE'ye maruz bırakılan (5 mM), insan lenfoblastoid hücre hatlarında (AHH-1, h2E1 ve MCL-5) MN frekansının arttığı bildirilmiştir (Doherty ve ark., 1996). White ve ark. (2001)'da, MCL-5 hücre hattında PCE (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM) ile 24 saat inkübasyondan sonra MN indüksiyonunda doza bağlı artış gözlemlenmiştir.

PCE'nin DNA zincir kırıkları üzerine etkisini araştıran birkaç *in vivo* çalışma bulunmasına rağmen bunlarda da sonuçlar çelişkilidir. İntraperitoneal yolla PCE'ye maruz bırakılan (663–1,326 mg/kg, tek uygulama, 1 saat) erkek farelerde, DNA tek zincir kırıkları karaciğer ve böbrek dokusunda gözlenirken akciğer dokusunda gözlenmemiştir. Fakat, araştırcılar, karaciğer ve böbrek hücrelerinde artan bu etkinin muameleden sonraki 24 saat içinde muhtemelen DNA onarılması yoluyla geri döndüğünü bildirmişlerdir (Wallis, 1986). Başka bir çalışmada, Potter ve ark. (1996), oral yoldan günlük 1000 mg/kg PCE ile 7 gün süreyle muamele edilen erkek F344 sıçanlarının böbreklerinde DNA zincir kırılma oranında herhangi bir artış bulamamıştır.

Cederberg ve ark.'nın (2010)'da yaptıkları çalışmada, CD-1 fareleri, PCE'ye oral gavaj yoluyla (1000 veya 2.000 mg/kg-gün, 24 saat aralıklarla, iki kez) maruz bırakılmış ve son uygulamadan 3 saat sonra karaciğer ve böbrek dokularındaki DNA hasarı alkalik komet testiyle ölçülmüştür. Bu çalışmanın sonuçlarına göre; araştırcılar, PCE'nin hepatositlerde doza bağlı ve istatistiksel olarak önemli bir şekilde DNA kuyruk yoğunluğunu arttırdığını (bundan dolayı karaciğerde DNA hasarına neden olduğunu) fakat benzer etkinin böbrek dokusunda gözlenmediğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Cederberg ve ark. (2010) tarafından yapılan bu çalışmanın sonuçlarının istatistiksel ve biyolojik önemi tartışmalıdır (Lillford ve ark., 2010; Lovell, 2010; Struwe ve ark., 2011).

Görüldüğü gibi, PCE'nin muhtemel genotoksik etkileri üzerine çeşitli test sistemlerinde yapılan birçok çalışma olmasına rağmen ortaya çıkan sonuçlar çelişkilidir.

Ayrıca, birden fazla negatif sonucun, tek bir mutajenite analizinde açık bir pozitif sonuç ile ortaya çıkan mutajenik etki için endişeyi ortadan kaldırmak için yeterli olmayabileceğini de göz ardı etmemek gerekir (Eastmond ve ark., 2009). Bunun da ötesinde, PCE revize edilmiş Zehirli Maddeler Kontrol Yasası (USEPA, 2017) kapsamında insan sağlığına ve çevreye yönelik risklere ilişkin en önemli 10 kimyasal madde arasında yer almaktadır.

Bu nedenle, tüm dünyada ve özellikle ülkemizde yaygın olarak kullanılan bu sentetik kimyasalın muhtemel genotoksik etkilerinin belirlenmesinin ve koruyucu önlemlerin alınmasının önemli olduğu düşüncesindeyiz. DNA hasarının belirlenmesinin, ksenobiyotiklerin genotoksik potansiyelini göstermesi ve etkilenen organizmalardaki hasarın erken bir göstergesi olması açısından risk değerlendirmesi için etkili ve faydalı bir strateji olarak kabul edilmektedir (Gedik ve ark., 2002).

Genotoksisite, bir maddenin, canlı bir organizmanın nükleotit diziliminde veya çift sarmal DNA yapısında değişiklikleri arttırabilme kapasitesidir. Genotoksik bir maddeye maruz kalmak, oksidatif hasar da dahil olmak üzere çeşitli bozukluklara yol açan DNA'nın bütünlüğünü değiştirebilen olaylar dizisine neden olabilir (Rocco ve ark, 2015).

Oksidatif stres, hücrel metabolizma sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı ile onları detoksifiye eden antioksidanların yetersizliği sonucu oksidatif dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır (Özcan ve ark., 2015). Yani, oksidatif streste, oksidan/antioksidan arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması söz konusudur. Oksidatif stres, kanser, nörolojik bozukluklar(Jenner, 2003; Lyras ve ark., 1997; Sayre ve ark., 2001; Toshniwal ve Zarling, 1992), ateroskleroz hipertansiyon, iskem/perfüzyon (Dhalla ve ark., 2000; Kasparova ve ark., 2005; Kerr ve ark., 1999; Kukreja ve Hess, 1992) diyabet, akut solunum sıkıntısı sendromu, idiyopatik pulmoner fibroz, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (Asami ve ark., 1997) ve astım (Andreadis ve ark., 2003; Comhair ve ark., 2005a; 2005b; Dut ve ark., 2008; Ercan ve ark., 2006; Fitzpatrick ve ark., 2009) gibi birçok patolojik duruma katkıda bulunur.

Sağlıklı yaşam için, oksidatif stres ile vücudun antioksidan savunması arasında hassas bir denge sağlanmalıdır (Dasgupta ve Klein, 2014). Yapılan çalışmalarda, birçok sentetik kimyasal maddenin toksisite mekanizmasının süperoksit anyonları, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS), hücrenin doğal savunma mekanizmasının nötralize edebileceğinden daha fazla oluşumuyla ilgili olduğu bulunmuştur (Lioi ve ark., 1998; Giray ve ark., 2001; Banerjee ve ark., 2001; Muniz ve ark., 2008).

Vücudun antioksidan mekanizması iyi bir şekilde çalışmazsa, fazla serbest radikaller (yüksek reaktivite nedeniyle) lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik

asitler dahil olmak üzere hemen hemen tüm biyomoleküllere zarar verebilir (Dasgupta ve Klein, 2014).

Biyolojik sistemlerde, endojen ve ekzojen kökenli stres faktörleri sebebiyle devamlı olarak serbest radikaller ve diğer oksijen kökenli türler üretildiğinden dolayı, hücre bu stres faktörlerinden kurtulmak için güçlü ve kompleks bir antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir (Miller ve Slebodzinska, 1993; Lanhance ve ark., 2001).

Vücudun antioksidan savunması, üç geniş kategoride sınıflandırılabilen hem endojen hem de diyet kaynaklı eksojen bileşiklerden oluşur: antioksidan enzimler, zincir bozucu antioksidanlar ve metal bağlanma proteinleri. Endojen orijinli olan temel antioksidan enzimler, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve peroksidazlardır. Serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonlarına müdahale eden antioksidanlar zincir kırıcı antioksidanlar olarak bilinir. Bu antioksidanlar, suda veya lipitte çözünebilir küçük moleküllerdir. Bu antioksidanların bazıları, besinlerden gelen karotenoidler, flavonoidler ve antioksidan vitaminlerdir.  $\alpha$ -Tokoferol (E vitamini) ve askorbik asit (C vitamini) bilinen ve en önemli doğal antioksidanlardır. Ayrıca, ferritin, transferrin ve seruloplazmin gibi endojen proteinler önemli antioksidan proteinler arasındadır. Çünkü, bu proteinler bakır ve demir gibi metal iyonlarını bağlayabilir, böylece Fenton reaksiyonu ile serbest radikaller üretilmez. Genellikle, antioksidan enzimler en güçlü antioksidan savunmasını sağlarlar, ancak tüm antioksidanlar oksidatif stresin uygun bir şekilde nötralizasyonu için önemlidir (Dasgupta ve Klein, 2014).

Antioksidanların oksidatif stres ile mücadeleden başka gıdalarda raf ömrü uzatma ile ilgili rolleri de vardır. Antioksidanlar, radikal zincir reaksiyonlarını önleyerek oksidasyonu engellemek için gıdalara sıklıkla eklenirler. Reaksiyonu sonlandırmaya yol açan başlatma ve çoğaltma adımını inhibe ederek etki ederler ve böylece gıdalardaki oksidasyon sürecini geciktirirler (Gülcin, 2012).

Bu çalışmada PCE'nin muhtemel genotoksik etkisi üzerine koruyucu etkisinin olup olmadığı araştırılacak madde olan E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol), bu vitaminin büyük bir antioksidan kapasitesinden sorumlu olan çok aktif bir hidroksil grubuna sahip, lipitte çözünür bir fenolik türevidir (Denisov ve Afanas'ev, 2005).

"E Vitamini", ilk olarak 1922'de normal üremeye izin vermek için sıçanların beslenmesinde temel olduğu keşfedilen, yağda çözünen bir 'faktöre' atıfta bulunmak için kullanılan bir terimdir. Daha sonra yapılan çalışmalar E vitaminin diğer hayvanlar için

de gerekli olduğunu göstermiştir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Düşük E vitamini alımı, laboratuvar hayvanlarının bazı toksinlere veya iskemi-reperfüzyon gibi doku hasarlarına duyarlılığını artırır (Willy ve ark., 1995). İnsan beslenmesinde E vitamininin kısa süreli yokluğu hastalıklara neden olmaz, ancak uzun süreli yokluğu yıkıcı olmaktadır (Muller ve Goss-Sampson, 1990). E vitamini diyet kaynakları arasında buğday tohumu, bitkisel yağlar, badem ve fındık (Jiang, 2014), tahıllar ve yeşil yapraklı sebzeler bulunur (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Yapılan araştırmalar gıdalarla birlikte alınan E vitamininin herhangi bir olumsuz ya da toksik etkisi bulunmadığını göstermiştir (Institute of Medicine, 2000; NIH, 2019). Bununla birlikte, yüksek dozlarda sentetik  $\alpha$ - tokoferol takviyelerinin, hayvanlarda kan pıhtılaşmasını engelleyebileceği bildirilmiştir (NIH, 2019).

E vitamininin yetişkinler için günlük tavsiye edilen miktarı (Recommended Dietary Allowances) 15 mg; tolere edilebilir miktarı (Tolerable Upper Intake Levels) ise 1000 mg (1500 IU) olarak bildirilmiştir. Erişkinlerde günlük 1000 mg'a kadar olan dozların (doğal form için 1500 IU/gün ya da sentetik form için 1100 IU/gün) güvenilir olduğuna dair veriler elde edilmiştir (NIH, 2019).

E vitamini, sadece bitkiler tarafından üretilen ve sekiz homologa sahip (metil grubu sayısı ve fitol yan zincirin doymuşluğuna göre ayırılan) vitamin formunu kapsamaktadır. Bunlar trimetil ( $\alpha$ ), dimetil ( $\beta$  veya  $\gamma$ ) ve monometil ( $\delta$ ) tokoferol ve her birine karşılık gelen tokotrienollerdir (Traber ve Arai, 1999). Yani  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - tokoferoller ve  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocotrienollerdir [*alfa*(5,7,8-trimetil), *beta* (5,8-dimetil), *gamma* (7,8-dimetil), and *delta* (8-metil)] (Bahtnagar ve Kulshrestha, 2017). Tokoferoller doymuş bir fitol kuyruğuna sahipken, tokotrienollerin fitol kuyruğu doymamıştır (Burton, 1994; Lee ve Ulatowski, 2019). E vitamini ailesinin doğal olarak meydana gelen sekiz üyesinin hepsi biyolojik olarak aktiftir; ancak, memelilerde,  $\alpha$ -tokoferolün biyolojik olarak en aktif olduğu kabul edilir (Lee ve Ulatowski, 2019).

Diyetle alınan E vitamininin bütün formları bağırsak hücreleri tarafından emilerek şilomikronlar içinde dolaşıma salınırlar ve şilomikron artıkları vasıtasıyla karaciğere ulaşırlar. Karaciğerde bulunan  $\alpha$ -tokoferol transfer protein, spesifik olarak  $\alpha$ -tokoferolü çok düşük dansiteli lipoproteinler içine taşır.  $\alpha$ -Tokoferol dışında kalan diğer tokoferoller ve tokotrienoller ise karaciğer tarafından alıkonularak safra ve idrar yoluyla karboksietil-hidroksikromanlar şeklinde atılırlar (Singh ve ark., 2005).

“Tokoferol” kelimesi Yunanca’da tokos (doğum) ve phero (ortaya çıkarmak) kelimelerinden gelmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Hayvanlarda en etkili formu, daha önce d- $\alpha$ -tokoferol olarak adlandırılan RRR- $\alpha$ -tokoferoldür. Bitkiler ve onların yağları genellikle bir tokoferol karışımı içerir; örneğin soya, mısır, ceviz ve kolza yağlarında,  $\alpha$ -tokoferolden daha fazla  $\gamma$ -tokoferol vardır. Buna karşılık, badem ve ayçiçeği yağı çoğunlukla  $\alpha$ -tokoferol içerir (Jiang, 2014). Hurma yağı, tocotrienoller bakımından zengindir (toplam E vitamininin % 75’i; sadece yaklaşık% 14’ü  $\alpha$ -tokoferoldür) (Sundram ve ark., 2003). Diğer tokoferoller ve tocotrienollerin hayvan biyo-tahlillerinde bir miktar “E vitamini aktivitesi” olmasına rağmen, literatürde " $\alpha$ -tokoferol" ve "E vitamini" terimleri birbirinin yerine kullanılmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Tokoferoller, lipofilik özelliklerinden dolayı, hızla lipit hidroperoksitlerle etkileşime girebileceği yerler olan membranlarda ve depo lipitlerde lokalize olurlar (Halliwell ve Gutteridge, 2015) ve lipit peroksil radikallerinin temizleyicileri olarak işlev gören yağda çözünen antioksidanlar olarak bilinirler (Bahtnagar ve Kulshrestha, 2017). Tokoferoller, *in vitro* ve *in vivo* olarak güçlü antioksidanlardır. Gıdalar, kozmetikler, farmasötik ürünler gibi birçok biyolojik olmayan sistemlerde de antioksidan olarak kesinlikle çok faydalıdır (Bahtnagar ve Kulshrestha, 2017).Tokoferollerin gıda antioksidanları olarak koruyucu etkileri hakkında birçok rapor bulunmaktadır (Dougherty, 1988).

E vitamini, kararlı bir lipit hidroperoksit vermek amacıyla, zar fosfolipitlerinden veya lipoproteinlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinden üretilen peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek peroksidatif zincirleri sonlandırır. Böylece, zararlı lipit radikalleri etkin olarak azaltarak dokuları serbest radikal saldırısından korur (Altiner ve ark., 2017).  $\alpha$ -Tokoferol, fenolik hidrojenini lipit peroksil radikallerini yayan zincire vererek, oksidatif işlemler zincirini sonlandırır. Bu reaksiyon sonunda reaktif  $\alpha$ -tokoferoksil radikalının üretimi artar (Zhang ve Omaye, 2001). Fakat  $\alpha$ -tokoferoksil radikali oksidatif zincir reaksiyonunu devam ettiremez (Carocho ve Ferreira, 2013) ve daha sonra diğer antioksidanlar tarafından bir ara forma indirgenerek E vitamini tekrar rejenere edilir (Traber ve Atkinson, 2007). C vitamini, ubikinon ve glutatyon gibi birçok indirgeyici maddeler tokoferoksil radikalının tokoferole geri dönüşümünü gerçekleştirmektedir (Bramley ve ark., 2000).

E vitamininin serbest radikal aracılı hasarı bastırmasındaki etkinliği ve önemli vitamin aktivitesiyle birlikte toksisitenin yokluğu, bu bileşiği, serbest radikallerin aşırı üretimi ile bağlantılı birçok patolojinin tedavisinde potansiyel olarak önemli bir ilaç haline getirmektedir (Denisov ve Afanas'ev, 2005).

Perkloretilenin insan periferel lenfositlerindeki olası genotoksik etkileri üzerinde E vitamininin koruyucu bir etkisinin olup olmadığı araştırılan bu çalışmada; çeşitli maddelerin genotoksik ve antigenotoksik etkilerinin belirlenmesinde yaygın ve etkili bir şekilde kullanılan, insan periferel kan lenfositlerinde *in vitro* Kromozom Anormalliği (KA) ve Sitokinez-bloklama Mikronükleus (MN) yöntemleri kullanılmıştır (Bonassi ve ark., 2008; Fenech ve ark., 2011a; 2011b; Fenech ve ark., 2016).

Kromozom Anormalliği testi, kromozomal seviyedeki sayısal (anöjenik etki) veya yapısal (klastojenik etki) değişikliklerin belirlenmesini sağlar. Bu testin önemi, deneysel ve epidemiyolojik kanıtların yapısal anormalliklerin karsinogenez sürecine dahil olduğunu göstermesiyle artmıştır. Bu nedenle, yüksek frekanstaki kromozomal anormalliklerin gelecekte gelişebilecek kanser riski ile ilişkili olduğu düşünölmektedir (Bonassi ve ark., 2004; 2005; 2008).

Mikronükleus, asentrik kromozom veya kromatid kırıklarının veya tüm kromozomların mitoz bölünmenin anafaz safhasındaki segregasyon işleminde iđ ipliklerine düzgün bir şekilde bağlanamaması ve bu ayrı kalmış kromozom ve fragmentlerin etraflarının zarla kaplanması sebebiyle ortaya çıkan ve telofazda oluşan kardeş çekirdeğin dışında kalan küçük çekirdeklerdir (Bonassi ve ark., 2003; 2007; Fenech, 2000; 2007; 2010; Fenech ve ark., 2003; Fenech ve ark., 2011b). MN testi, hem kromozomal düzeydeki kırılmaları hem de mitotik iğdeki değişiklikleri gösteren klastojenik ve anöjenik etkilere sahip bileşiklerin tanımlanmasını sağlar (Kirsch-Volders ve ark., 1997; Norppa ve Falck, 2003).

Bu çalışmanın amacı; kimyasal ara madde, metal temizleme ve yağdan arındırma işlemlerinde ve kuru temizleme merkezlerinde yaygın bir şekilde kullanılan PCE'nin 1) insan periferel kan lenfositlerinde, genotoksik ve/veya sitotoksik etkiye sahip olup olmadığını 2)  $\alpha$ - tokoferolün PCE tarafından oluşturulan muhtemel genotoksik hasar üzerinde koruyucu yani antigenotoksik etkilerinin olup olmadığını KA ve sitokinez bloklama MN testleri ile *in vitro* olarak araştırmaktır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Perkloretillen (PCE) ile Yapılan Genotoksisite Çalışmaları

Beliles ve ark. (1980) tarafından, erkek ve dişi Sprague-Dawley sıçanları, akut (6, 24 veya 48 saat muameleden sonra sakrifikasyon) ve subkronik (5 gün boyunca günde 7 saat; son maruz kalmadan 6 saat sonra sakrifikasyon) olarak solunum yoluyla PCE'ye maruz bırakıldıktan (100 ve 500 ppm) sonra kemik iliği kromozom anormallikleri ve anöploidi değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, sadece 500 ppm konsantrasyondaki PCE'ye akut olarak maruz bırakılan erkek farelerde anormal hücre yüzdesinde düşük bir artışın gözlemlendiğini; subkronik maruziyetlerin hiçbirinde önemli bir etkinin olmadığını ancak anormal hücrelerin dişi farelerde önemli olmayan bir artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, Beliles ve ark. (1980) yaptıkları bu çalışmada, gen mutasyonlarının, daha önce inhalasyon ile PCE'ye maruz kalan erkek ve dişi CD-1 farelerinin (100 veya 500 ppm, 7 saat/gün; 5 gün) periton boşluğuna implante edilen *Salmonella typhimurium* suşu (TA98) kullanılarak yapılan konak-aracılı (host-mediated) deneyde indüklendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından, pozitif sonuçların erkek farelerde 100 ppm'de (500 ppm hariç) ve dişi farelerde 500 ppm'de (100 ppm hariç) gözlemlendiği ve PCE'nin *in vivo* aktivasyon kullanarak aktif bir çerçeve kayması mutajeni olduğu bildirilmiştir.

PCE'ye maruz bırakılan (S9 aktivasyon olmadan 17, 34.1, 68.1, ve 136.3 µg/ml ya da 17, 34.1 ve 68.1 µg/ml Sprague-Dawley sıçan karaciğeri S9 aktivasyon varlığında) Çin hamsteri ovaryum (CHO) hücrelerinde kromozomal anormalliklerin gözlenmediği bildirilmiştir (NTP, 1986).

Wallis (1986), erkek farelere intraperitoneal (i.p) yolla 4–8 mmol/kg (663–1326 mg/kg) PCE uyguladıktan 1 saat sonra, farelerin karaciğer ve böbrek dokularında tek iplikli DNA zincir kırıklarının doğrusal bir şekilde arttığını ancak akciğer dokularında DNA zincir kırıklarına rastlanmadığını bildirmiştir. Araştırmacı, aynı zamanda bu hasarın enjeksiyondan 24 saat sonra tamamen onarıldığını da bildirmiştir.

Mazzullo ve ark. (1987), PCE'nin intraperitoneal enjeksiyonundan sonra *in vivo* olarak erkek BALB/c fare Wistar sıçanlarının karaciğer, böbrek, akciğer ve mide DNA, RNA ve proteinlerine kovalent olarak bağlandığını göstermişlerdir.



Hartmann ve Speit (1995), tarafından PCE'nin muhtemel genotoksik etkisi S9 metabolik aktivasyon varlığında ve yokluğunda insan kan hücrelerinde tek hücre jel elektroforez (komet testi) ve KKD testi ile çalışılmıştır. Çalışma sonucunda, araştırmacılar, 5 mM (~830 mg/l) (1 saat uygulama) konsantrasyondaki PCE'nin hücre canlılığını yaklaşık % 40 azaltarak açık bir şekilde sitotoksik etki göstermesine rağmen komet testine göre beyaz kan hücrelerinde DNA hasarını arttırmadığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, 2 ve 24 saat boyunca 5 mM'a kadar olan konsantrasyonlardaki PCE'nin, insan lenfositlerinde KKD frekansını arttırmadığı bildirilmiştir. En yüksek konsantrasyonda (5 mM, 24 saat uygulama) KKD'yi indüklemiş ve proliferasyon indeksini (PI) düşürmüştür.

Murakami ve Horikawa (1995) tarafından yapılan çalışmada, kısmi hepatektomi yapılan ddY farelerine 1.000 ya da 2.000 mg/kg PCE'nin bir defa intraperitoneal olarak enjeksiyonunun, hepatositlerde MN sıklığını artırdığı fakat, ddY farelerinin periferik kan retikülositlerinde MN frekansında artışa neden olmadığı bildirilmiştir.

Doherty ve ark. (1996), MN indüksiyonunun, PCE'ye maruz kalan AHH-1 parental insan lenfoblastoid hücrelerinde ve insan metabolik enzim hatlarını kararlı bir şekilde ifade eden iki hücre hattında (h2E1 ve MCL-5) arttığı bildirilmiştir. Parental AHH-1 hücreleri düşük olsa da doğal CYP1A1 aktivitesine fakat önemli glutatyon-S-transferaz aktivitesine sahiptir; h2E1 hücreleri kararlı bir şekilde insan CYP2E1'i eksprese eder; ve MCL-5 hücreleri de insan CYP1A2, 2A6, 3A4, 2E1 ve mikrozomal epoksit hidrolazı stabil bir şekilde eksprese eder. PCE (5 mM), MN'lerin AHH-1 hücrelerinde üç kat, h2E1 ve MCL-5 hücrelerinde dokuz kat artışına neden olmuştur (Doherty ve ark., 1996).

Potter ve ark. (1996) tarafından erkek F344 sıçanları, oral gavaj yoluyla 7 gün boyunca günlük 1.000 mg/kg perkloroetilen ile muamele edilmiştir. Çalışma sonucunda, farelerin böbreklerdeki DNA zinciri kırılmalarında kontrole göre önemli bir artış olmadığını bildirmişlerdir.

Da Silva Augusto ve ark. (1997), Brezilya'nın güneydoğu bölgesinde bulunan Sao Paulo şehrindeki kimyasal endüstride çalışan ve klorlu solventlere (karbon tetrakloid, perkloroetilen, heksaklorobenzen) maruz kalan 41 işçi ve bu solventlere maruz kalmayan 28 işçinin periferik kan lenfositlerinde sitokinez bloklama MN testi ile genotoksisite değerlendirmesi yapmışlardır. Araştırmacılar, çalışmalarının sonucunda, bu solventlere

maruz kalan grupta gözlenen MN frekansının maruz kalmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Matsushima ve ark. (1999), PCE ile yüksek konsantrasyonlarda (125–250 µg/ml) muamele edilen Çin hamsteri akciğer hücre hattında (CHL/IU) mikronükleus oluşumunun indüklenmediği, fakat daha düşük konsantrasyondaki PCE uygulanan (75 µg/ml) CHL/IU hücrelerinde S9 metabolik aktivasyon varlığında istatistiksel olarak önemli olmasa da bir artışın olduğunu bildirmişlerdir.

Toraason ve ark. (1999), trikloretilen (TCE) veya PCE'ye 0, 100, 500, 1000 mg/kg'lık konsantrasyonlarda akut olarak maruz kalan Fischer sıçanlarındaki oksidatif stres ve DNA hasarını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, araştırmacılar tarafından, sadece en yüksek konsantrasyonda (1000 mg/kg) uygulanan TCE'nin, sıçanların karaciğerinde oksidatif DNA hasarına neden olduğu; PCE'nin ise benzer bir hasara neden olmadığını bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2001) kapalı bir sistemde PCE'ye (kültür ortamında ~ 63 ppm) *in vitro* maruz bırakılan Çin hamsteri yumurtalık (CHO-K1) hücrelerinde MN indüksiyonunu incelediler. CHO-K1 hücreleri, PCE cam tabakasını çevreleyen bir petri kabına yerleştirildi ve 24 saat süreyle inkübe edildi. PCE maruziyeti MN indüksiyonunda doza bağlı anlamlı bir artışa yol açmıştır (p <0.001).

White ve ark. (2001) tarafından, değişik konsantrasyonlardaki PCE (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM) ile 24 saat inkübe edilen MCL-5 hücre hattında (p <0.05) MN indüksiyonunda konsantrasyona bağlı artışlar olduğu bildirilmiştir.

Cederberg ve ark. (2010), PCE'ye oral gavaj yoluyla (1000 veya 2.000 mg/kg-gün, 24 saat aralıklarla, iki kez) maruz bırakılan CD-1 farelerinde, komet testine göre, hepatositlerde önemli bir şekilde DNA kuyruk yoğunluğunu arttırdığını fakat böbrek dokusunda DNA hasarında bir artışa neden olmadığını bildirmişlerdir.

Ünsal (2013) tarafından yapılan çalışmada değişik konsantrasyonlardaki (1, 3 ve 5 mM) PCE ile *in vitro* olarak 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde KA, KKD ve MN oluşumunda konsantrasyona bağlı olarak artış saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca, aynı çalışmada PCE'nin PI ve MI'yı konsantrasyona bağlı olarak düşürerek sitotoksik aktivite gösterdiği ve bu maddenin insan periferik kan lenfositleri üzerinde *in vitro* genotoksik risk oluşturduğu bildirilmiştir.

McDermott ve Heffron (2013) tarafından, klorlu organik çözücülerden olan diklormetan (DMC), tetrakloretilen (PCE), 1,2 dikloretilen (DCE) ve trikloretilen (TCE)'in Jurkat T hücreleri üzerindeki *in vitro* sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırmada, Jurkat T hücreleri 72 saat süresince çözücülere ayrı ayrı maruz bırakılarak reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu, hücre çoğalması, hücre içi serbest Ca (Ca<sup>+2</sup>) konsantrasyonu ve kaspaz-3 aktivitesi ölçülmüştür. Araştırmacılar tarafından, çalışma sonucunda, ROS oluşumu ve hücre içi serbest Ca<sup>+2</sup>'da konsantrasyona bağlı bir artış olduğu ve bunun hücre çoğalmasında bir azalmaya eşlik ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, hücre çoğalmasının PCE>TCE>DCM>DCE şeklindeki bir sırayla azaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, Kaspaz-3 aktivitesinin TCE ve PCE uygulanan kültürlerde konsantrasyona bağlı bir şekilde arttığını, fakat DCM ile DCE uygulanan kültürlerde önemli bir değişiklik olmadığını belirtmişlerdir.

Purdue ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada mesleki olarak yüksek oranda PCE'ye maruziyetin böbrek kanseri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir.

Ünsal ve Çelik (2018) tarafından PCE'nin *Artemia salina* larvaları üzerindeki muhtemel sitotoksik etkisi Brine Shrimp Letalite Testi ile çalışılmıştır. Araştırmacılar, *in vitro* ortamda PCE'ye 24 saat maruz bırakılan *A. salina* larvaları üzerindeki sitotoksik etkinin sadece 1000 ppm konsantrasyonundaki PCE uygulaması sonucunda ortaya çıktığını, diğer konsantrasyonlarda (10 ve 100 ppm) ise sitotoksik aktivitesinin belirlenmediğini bildirmişlerdir.

Habib ve ark. (2018) yaptıkları çalışma sonucunda, işyerlerinde kişisel koruyucu ekipmanlardan hiçbirini kullanmayan kuru-temizleme çalışanlarının PCE ile ilişki sağlık problemleri açısından en yüksek risk altında oldukları bulunmuştur. Araştırmacılar kuru temizleme merkezlerinde yerel egzoz havalandırma sistemlerinin kurulması ve kullanılan PCE konsantrasyonlarının devamlı takip edilmesinin yanı sıra PCE'nin sağlık etkileri hakkında çalışanların bilinçlendirilmesi ve işlerini yaparken kişisel koruyucu ekipmanların kullanılmasının önemi hakkında bilgilendirilmeleri gerektiğinin önemli olduğu bildirilmiştir.

Aschengrau ve ark. (2018), doğum öncesi PCE ile kontamine olmuş içme suyuna maruziyet ile plasental abrupsiyon ve plasenta yetmezliği ortaya çıkması nedeniyle ölü doğum oranlarında lineer olarak doza bağlı bir artış gözlemlediklerini bildirmişlerdir.

## 2.2. E Vitamini ( $\alpha$ -Tokoferol)'nin Koruyucu Etkisi Üzerine Yapılan Çalışmalar

Konopacka ve ark. (1998) tarafından, farelerde gama ışınlarının klastojenik aktivitesi üzerine E vitamininin modifiye edici etkisi, fare kemik iliği polikromatik eritrositleri ve eksofoliyel mesane hücrelerinde *in vivo* MN testi ile incelenmiştir. Çalışmada, E vitamini, ya fareler 2 Gy gama ışını ile ışılandıktan hemen sonra ya da ışınlama yapılmadan önceki 5 gün boyunca oral yolla uygulanmıştır. Araştırmacılar, farelere ön-uygulama şeklinde verilen E vitamininin (100-200 mg/kg/gün) gama ışınları tarafından indüklenen MN'ye karşı korumada daha etkili olduğunu; bununla birlikte, ışınlamadan hemen sonra farelere E vitamini uygulanmasının da, radyasyona bağlı MN frekansının düşmesinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

E ve C vitaminlerinin bir antitümoral ajan olan doksorubisin uygulanan memeli hücreleri üzerindeki olası *in vivo* koruyucu etkilerini araştırmak için yapılan çalışmada, doksorubisin uygulanan wistar sıçanlarına bu vitaminler hem tek tek hem de her iki vitamin kombinasyon olacak şekilde uygulanmıştır. Çalışma sonucunda, düşük konsantrasyonlardaki vitaminlerin sıçanlara hem ayrı hem de birlikte uygulanmalarında doksorubisin tarafından indüklenen kromozom anormallikleri azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, çalışmada vitaminlerin kombinasyon halinde uygulanmasının doksorubisininden neden olduğu hasara karşı korumada tek başına uygulanan her vitaminden daha etkili olmadığı belirtilmiştir. Bundan başka, test edilen en yüksek vitamin konsantrasyonlarının kontrol ile karşılaştırıldığında analiz edilen parametrelerde değişikliğe neden olmadığı ve mevcut deneysel koşullar altında, vitaminlerin kromozom hasarına karşı koruma sağlamadaki etkinliğinin kullanılan doza bağlı olduğu bildirilmiştir (Antunes ve Takahashi, 1998).

Konopacka ve Rzeszowska-Wolny (2001), E vitamininin gama ışınıyla indüklenen DNA hasarına karşı koruyucu etkisini insan periferik lenfositlerinde *in vitro* MN testi ile araştırmışlardır. Araştırmacılar, kültüre alınmış lenfositleri, ya 2 Gy gama ışını uygulanmadan önce ya da uygulamadan sonra artan konsantrasyonlarda E vitaminine maruz bırakmışlardır. Çalışmada, E vitamininin koruyucu etkisinin her iki durumda da gözlemlendiği ancak en güçlü etkinin ışınlamadan sonra 1 saatten daha fazla gecikmeyen vitamin uygulamalarında olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, 2  $\mu$ g/ml'den daha yüksek konsantrasyonlardaki E vitamininin radyasyon tarafından indüklenen MN'yi

azaltmada daha etkili olduğu bildirilmiştir. Araştırcılar ayrıca, nükleer bölünme indeksi (NBI) verilerine göre, bu vitaminin gama ışını tarafından uyarılan sitotoksisiteyi etkilemediğini bildirmişlerdir.

Mazumdar ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada, Balb/C farelerine intraperitoneal olarak uygulanan 125, 250 and 500 mg/kg E vitamininin, uygulamadan 24 saat sonra farelerin kemik iliği hücrelerinde KA ve MN frekansını kontrole göre arttırdığı fakat uygulamadan 35 gün sonra bile eşey hücrelerinde herhangi bir sperm başı anormalliğine neden olmadığı bildirilmiştir. Aynı alışmada, E vitamini ile  n muamelenin kemoterapötik bir ilaç olan sisplatin tarafından indüklenen KA, MN ve sperm başı anormalliklerini önemli derecede azalttığı da bildirilmiştir. Sonuç olarak araştırcılar, E vitamini ile yapılan ön uygulamanın sisplatin tarafından tetiklenen genotoksisite ve sitotoksisiteyi azalttığı ve E vitamininin tek başına veya bir ilaç ile etkisinin arasında ince bir fark olduğu sonuçlarına varılmıştır.

Sharma ve Sharma (2012) tarafından, farklı konsantrasyonlardaki karbofuran (0, 0.5, 1.25, 2.5, 3.75 ve 5.0  $\mu\text{M}$ ) tarafından ortaya çıkan genotoksisiteye karşı E ve C vitaminlerinin iyileştirici etkisi insan periferal lenfositlerinde *in vitro* olarak araştırılmıştır. Çalışmada, lenfositlere karbofuran muamele edilmesinin konsantrasyona bağlı bir şekilde önemli DNA hasarı ortaya çıkardığı ve bu hasarın 10  $\mu\text{M}$  konsantrasyonda ilave edilen hem E hem de C vitamini ile azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, araştırcılar tarafından, E vitamininin C vitaminine kıyasla daha fazla koruma sağladığı ve insan lenfositleri d şuk konsantrasyondaki pestisitle muamele edildiklerinde bu vitaminlerin sağladığı koruma seviyesinin yükseldiği sonuçlarına vardıkları bildirilmiştir.

Purohit ve Rao (2014) tarafından insan kan kültürlerinde *in vitro* KKD testi kullanılarak yapılan çalışmada, melatonin (MLT) ve  $\alpha$ - tokoferolün civa kaynaklı genotoksisite üzerindeki koruyucu etkisi incelenmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre, araştırcılar tarafından,  $\alpha$ - tokoferol ve MLT'nin kültürlere ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmasının civanın neden olduğu genotoksik potansiyeli azalttığı bildirilmiştir.

Khabour ve ark. (2015) tarafından, Türkiye ve Orta Doğu'da yüksek sıklıkta görülen, multisistemik kronik enflamatuvar bir hastalık olan Behçet hastalığı (BD)'na sahip olan hastalardan alınarak kültüre edilmiş lenfositlerde gözlenen KKD frekansı

üzerine E vitamininin antioksidan etkisi çalışılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre; araştırmacılar, sağlıklı deneklere göre hastalardan elde edilen lenfositlerde KKD oranında istatistiksel olarak önemli bir yükselme görüldüğünü ve E vitamini uygulamasının bu artmış KKD oranını kontrol grubunda gözlenen normal seviyelere getirdiğini bildirmişlerdir.

Alqudah ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, bir antikanser ilacı olan oksaliplatinin insan periferal kan lenfositlerinde KA ve KKD frekansını kontrole göre önemli derecede arttırarak genotoksik aktiviteye sahip olduğu ve oksaliplatinin neden olduğu bu kromozomal hasarın, hücrelerin E vitamini ile ön uygulamadan geçirilmesiyle önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Ayrıca, oksaliplatinin hücre kinetik parametreleri olan, MI ve proliferatif indekste (PI) önemli bir azalmaya neden olduğunu; bununla birlikte, E vitamininin MI ve PI'daki bu azalmayı etkilemediğini bildirmişlerdir.

Ahmed ve ark. (2018), karbamatlı bir insektisit olan propoksurun kültüre alınmış insan periferal kan mononükleer hücrelerinde oksidatif stresi arttırarak genotoksik etki gösterdiğini; bununla birlikte, propoksur ve  $\alpha$ -tokoferol (4.3  $\mu\text{g/ml}$ )'ün kombinasyon halinde uygulandığı kültürlerde  $\alpha$ -tokoferolün, insektisit etkisiyle ortaya çıkan oksidatif stresi azalttığını bildirmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Deney materyali

Bu araştırmada, PCE'nin olası genotoksik etkilerini ve bu genetik hasara karşı  $\alpha$ - tokoferolün antigenotoksik etkilerini incelemek için materyal olarak insan periferel kan lenfositleri kullanılmıştır. Değerlendirme için kullanılan kan, sağlıklı, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, geçirdiği herhangi bir ciddi hastalığı olmayan ve genotoksik olduğu bilinen maddelere maruz kalmamış dört farklı (23–25 yaşlarında, 2 bayan ve 2 erkek) bireyden temin edilmiştir.

Bu çalışmanın etik kurallara uygunluğu, Fırat Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06/07/2017 tarih ve 15 nolu kararı ile onaylanmıştır.

##### 3.1.2. Test Edilen Maddeler

###### 3.1.2.1. Perkloretilen (PCE)

Bu çalışmada genotoksik etkisi araştırılacak madde olan PCE, kuru temizleme, tekstil işleme ve metal temizleme işlemlerinde kullanılmak üzere ticari olarak üretilen ve yaygın olarak kullanılan bir çözücüdür (USEPA, 2012). Bu çalışmada kullanılan PCE (371696- Perchloroethylene, saflık:  $\geq 99\%$ , CAS No: 127-18-4) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Perkloretilenin kimyasal ve fiziksel özellikleri izelge 3.1'de, yapısal formülü Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Perkloretilenin kimyasal ve fiziksel zellikleri (USEPA, 2012)

<b>Moleküler formülü</b>	C <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub>
<b>Molekül ağırlığı</b>	165.83 g/mol
<b>Renk</b>	Renksiz
<b>Fiziksel durumu</b>	Sıvı (oda sıcaklığında)

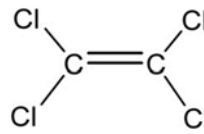
Çizelge 3.1 (Devam). Perkloretilenin kimyasal ve fiziksel özellikleri (USEPA, 2012)

<b>Erime noktası</b>	-19°C
<b>Kaynama noktası</b>	121°C
<b>Yoğunluk</b>	1.6227 g/mL (20 oC)
<b>Koku</b>	Eteral (etere benzer)
<b>Koku eşiği (suda)</b>	0.3 ppm
<b>Koku eşiği (havada)</b>	0.1 ppm
<b>Çözünürlük (25°C'de suda)</b>	150 mg/L
<b>Çözünürlük (organik solventlerde)</b>	Alkol, eter, kloroform, benzen, çözücü heksan ve sabit ve uçucu yağların çoğu ile karışabilir
<b>Buhar basıncı (25°C)</b>	18.47 mm Hg
<b>Yanıcılık sınırları</b>	Yanıcı değil

**IUPAC adı:** Tetrachloroethylene

**Sinonimleri:** Ethylene tetrachloride, PCE, 'per', PER, PERC, perchlorethylene, perchloroethene, perchloroethylene, tetrachlorethylene, 1,1,2,2-tetrachloroethene, 1,1,2,2-tetrachloroethylene (IARC, 2014).

**Ticari Adları:** Ankilostin, Antisol 1, Didakene, Dow-per, Dilatin PT, Fedal-Un, Nema, Perawin, Perchlor, Perclene, Percosolv, Perklone, PerSec, Tetlen, Tetracap, Tetraleno, Tetralex, Tetravec, Tetroguer ve Tetropil (IARC, 2014).



Şekil 3.1. Perkloretilenin yapısal formülü

### 3.1.2.2. $\alpha$ -Tokoferol

Bu araştırmada, PCE'nin olası genotoksik etkileri üzerine antigenotoksik etkisinin olup olmadığı araştırılan antioksidan madde olan  $\alpha$ -tokoferol (E vitamini) yağda çözünen bir vitamindir. Çalışmamızda kullanılan  $\alpha$ -tokoferol (T 3251, ( $\pm$ )- $\alpha$ -

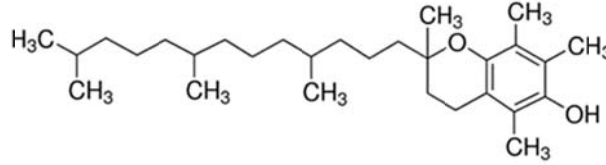


Tocopherol, saflık:  $\geq 96$  %, CAS No: 10191-41-0) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir.  $\alpha$ -Tokoferolün yapısal formülü Şekil 3.2de gösterilmiştir.

**Moleküler formülü:**  $C_{29}H_{50}O_2$

**Molekül ağırlığı:** 430.71g/mol

**Sinonimleri:** DL-all-rac- $\alpha$ -Tocopherol, Vitamin E



Şekil 3.2.  $\alpha$ -Tokoferolün yapısal formülü

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hücre kültürü yapmak için kullanılan kromozom medyumunu (Chromosome Medium B, Cat No. F 5023) Biochrom firmasından temin edilmiştir. Bu çalışmada, hem PCE'nin hem de  $\alpha$ -tokoferolün çözücüsü olarak kullanılan dimetilsülfoksit (DMSO, Cas No:67-68-5), pozitif kontrol olarak kullanılan mitomisin C (MMC, Cas No:50-07-7) Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Ayrıca, çalışma kapsamında kullanılan sitokalasin-B (Cas No:14930-96-2) ve kolşisin (Cas No: 64-86-8) Sigma-Aldrich firmasından; giemsa (Cat. No. 9204), entellan (Cat. No. 7961), immersiyon yağı ve nitrik asit ( $HNO_3$ ) ise Merck firmasından satın alınmıştır.

### 3.1.4. Hipotonik Çözelti

Bu çözelti, % 0,4'lük KCl (Merck) olacak şekilde bidistile su kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti + 4 °C buzdolabında saklanmış ve her deneyden yaklaşık iki saat önce yeterli miktarı 37 °C'deki inkübatörde ısıtıldıktan sonra kullanılmıştır.

### 3.1.5. Fiksatif

Kromozom anormalliği deneyleri için; 1 hacim asetik asit (Merck) ve 3 hacim metanoldan (Merck) oluşan fiksatif kullanılmıştır. Mikronükleus deneylerinde ise ilk fiksatif; 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol: 6 hacim % 0.9'luk NaCl karışımından; iki ve üçüncü fiksatif ise; 1 hacim glasiyal asetik asit: 5 hacim metanol karışımından elde edilmiştir.

### 3.1.6. Sorensen Tamponu

Sorensen Tamponu A ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH=4.8) ve Sorensen Tamponu B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , pH=9.3) olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanarak kullanılabildiği kadar +4 °C buzdolabında saklanmıştır.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  Merck firmasından temin edilmiştir.

### 3.1.7. Nitrik Asit çözeltisi

Çalışmada kullanılan lamları temizlemek amacıyla 1 N nitrik asit ( $\text{HNO}_3$ ) (Merck) çözeltisi hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Kromozom Anormalliği (KA) Testi

#### 3.2.1.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

İnsan periferik kan lenfositlerindeki *in vitro* KA testi bazı değişikliklerle Evans (1984)'in metoduna göre uygulanmıştır (Kocaman ve Topaktaş, 2007).

PCE'nin insan lenfositlerindeki genotoksik etkilerini inceleyebilmek için, öncelikle test edilecek olan PCE konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu amaçla yapılan ön denemelerde, 150 µg/ml konsantrasyondaki PCE'nin insan lenfositlerine uygulanmasının, MI'yı çözücü kontrole kıyasla % 50 azalttığı belirlenmiştir. Bu

nedenle, yarı maksimal inhibisyon konsantrasyonu ( $IC_{50}$ , half-maximal inhibitory concentration) olarak -MI'yı negatif kontrole göre % 50 düşüren konsantrasyon-150  $\mu\text{g/ml}$  kabul edilmiştir. Böylece, çalışmamızda PCE için en yüksek konsantrasyon 150  $\mu\text{g/ml}$  olarak seçilmiştir. Diğer konsantrasyonlar ise 150  $\mu\text{g/ml}$ 'den paralel bir şekilde azalan 100, 50 ve 25  $\mu\text{g/ml}$  olarak kullanılmıştır. PCE'nin muhtemel genotoksitesi üzerine antigenotoksik yani koruyucu etkisinin olup olmadığını araştıracağımız  $\alpha$ -tokoferol konsantrasyonu ise 100  $\mu\text{g/ml}$  olarak kullanılmıştır (Smalls ve Patterson, 1982).

İnsan periferik kan hücrelerinde KA analizleri için; 23-25 yaşlarında, sağlıklı ve sigara kullanmayan iki kadın ve iki erkek bireyden alınmış olan periferik kan örneklerinin (1/10 oranında heparinize edilmiştir) 0.2 ml'si steril koşullarda 2.5 ml kromozom medyumu içeren kültür tüplerine ekilerek (Rencüzoğulları ve Topaktaş, 1991),  $37\pm 1$  °C'deki inkübatörde 72 saat boyunca kültüre alınmıştır.

Çalışma iki grup halinde yapılmıştır. Birinci grupta, PCE'nin insan lenfositlerindeki genotoksik etkisini incelemek için, ön denemelerle belirlenen konsantrasyonlardaki PCE (25, 50, 100 ve 150  $\mu\text{g/ml}$ ) kültür ortamına kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra ilave edilmiştir. Her deneyde, bir çözücü (negatif) kontrol (7  $\mu\text{l/ml}$  DMSO) ve bir pozitif kontrol (0.16  $\mu\text{g/ml}$  MMC) de yapılmıştır. İkinci grupta ise,  $\alpha$ -tokoferolün PCE üzerindeki muhtemel antigenotoksik etkisini incelemek için, 100  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyondaki  $\alpha$ -tokoferol hem tek başına hem de test maddesinin yukarıda belirtilen konsantrasyonlarıyla birlikte eş zamanlı olarak (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu\text{g/ml}$ ; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra kültür tüplerine ilave edilmiştir. Böylece, PCE hem tek başına hem de  $\alpha$ -tokoferol ile karışım halinde insan lenfositlerine 48 saat uygulanmış olmaktadır.

Kültür süresinin 70'inci saatinde her kültür tüpüne kolşisin eriyiği (0.06  $\mu\text{g/ml}$ ) ilave edilerek hücrelerin 2 saat boyunca (37 °C'de) kolşisin ile muamele edilmesi sağlanmıştır. Toplam 72 saat inkübasyonun sonunda, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Daha sonra tüplere hipotonik eriyik (% 0.4 KCl, 37 °C) ilave edilmiştir.

Hücrelere 13 dk. süresince hipotonik eriyik uygulandıktan sonra, kültür tüpleri 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilerek süpernatantı atılmıştır. Daha sonra kültürler 5'er ml soğuk fiksatif (1/3 glasiyal asetik asit:metanol) yavaş yavaş ve karıştırarak ilave

edilmiştir. Fiksatif ile oda sıcaklığında 20 dk. muamele edilen hücreler 1200 rpm'de 15 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Fiksatif uygulaması en az üç kez tekrarlanarak tüpte kalan sıvının berraklaşması sağlanmıştır.

Son yapılan santrifüjün ardından tüplerin dibinde yaklaşık 0.5-0.7 ml kadar sıvı kalacak şekilde süpernatant atılmıştır. Geri kalan hücre süspansiyonundan 4-5 damla olacak şekilde pastör pipeti ile çekilerek, temiz ve soğuk lamalar üzerine yaklaşık 50 cm yükseklikten damlatılmış ve hücrelerin lam üzerine yayılması sağlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurumaları için üzerleri kapalı bir şekilde 24 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır.

### **3.2.2. Sitokinez-Bloklama Mikronükleus(MN) Testi**

#### **3.2.2.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması**

Sitokinez-bloklama MN testinde, bazı değişikliklerle Fenech (2000), Rothfuss ve ark. (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003)'nin yöntemleri kullanılmıştır.

MN testi için, 4 (dört) sağlıklı insandan alınmış olan periferik kanın 0.2ml'si, 2.5 ml kromozom medyumunu içeren kültür tüplerine ekilmiş ve hücreler  $37\pm 1$  °C'de 68 saat inkübe edilmiştir.

PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferolün insan lenfositlerindeki MN oluşumu üzerine etkisini incelemek için 25, 50, 100 ve 150  $\mu$ g/ml PCE hem tek başına hem de aynı konsantrasyonlardaki PCE ile birlikte 100  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki  $\alpha$ -tokoferol eş zamanlı olarak (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) kültür ortamına kültürün başlangıcından 20 saat sonra ilave edilmiştir. Böylece test maddelerinin insan lenfositlerine 48 saat süre ile uygulanması sağlanmıştır. Ayrıca her deney grubu için çözücü (7  $\mu$ l/ml DMSO), pozitif (0.16  $\mu$ g/ml MMC) ve sadece  $\alpha$ -tokoferol (100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -tokoferol) içeren birer kontrol tüpleri hazırlanmıştır.

İnkübasyonun 44. saatinde her kültür tüpüne sitokalsin-B (6  $\mu$ g/ml) maddesi ilave edilerek bölünen hücrelerde sitokinezin engellenmesi sağlanmıştır. İnkübasyonun 68'inci saatinde, kültür tüpleri 2000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Geriye kalan hücrelere % 0.4'lük KCI ( $37\pm 1$  °C'de 5 dk.) uygulaması

yapılmıştır. Daha sonra, kültürler 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmış ve fiksatif uygulamasına geçilmiştir. Kültürler önce 1:5:6, glasiyal asetik asit: metanol: % 0.9 NaCl'den oluşan fiksatif ile oda sıcaklığında 15 dakika muamele edilmiştir. Daha sonra 1200 rpm'de 10 dk. santrifüjlenen tüplerden süpernatant atıldıktan sonra ikinci fiksatif (1:5, glasiyal asetik asit: metanol) uygulaması yapılmıştır. Sonra 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj yapılarak süpernatant atılmış ve tüplere tekrar fiksatif uygulanarak 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Son olarak kültür tüpleri 1200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Kültür tüplerinin dibinde toplanmış olan hücreler resüspanse edilerek pastör pipetine çekilmiş ve elde edilen hücre süspansiyonu temiz lamlar üzerine yaklaşık olarak 10 cm yükseklikten damlatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan lenfosit yayılmış preparatlar 24 saat süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

### **3.2.3. Kromozom Anormalliği ve Mikronükleus Analizleri için Preparatların Boyanması**

Hazırlanan preparatlar kuruduktan sonra Sorensen tamponunda hazırlanmış %5'lik Giemsa boyası ile boyanmıştır. (%5'lik Giemsa boyasının hazırlanması: 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerine 100 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiş ve filtre kâğıdı yardımıyla süzölmüştür, pH=6.8). Preparatlar yaklaşık olarak 25dk. boya içerisinde bekletilerek boyanmaları sağlanmış ve saf sudan geçirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruma işleminden sonra preparatlar entellan ile kapatılarak incelemeye hazır daimi preparat haline getirilmiştir.

### **3.2.4. Mikroskopik İnceleme**

Preparatlar, OLYMPUS marka CX21 model ışık mikroskopunda, KA analizi için 10X100=1000 büyütmede, MN analizi için 10X40=400 büyütmede incelenmiştir.

#### **3.2.4.1. Kromozom Anormallikleri (KA) ve Mitotik İndeksin (MI) Saptanması**

Kromozom anormalliği incelemek için hazırlanan preparatlarda, PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferolün hem KA oluşumu üzerine etkisi araştırılmış hem de mitoz bölünme üzerine etkisini incelemek için MI belirlenmiştir.

Daimi preparatlarda KA'lar belirlenirken her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış metafaz kromozomlarına sahip toplam 100 hücre (her bir konsantrasyon için toplam 400 hücre) incelenmiştir. İncelemeler sırasında gözlenen anormallikler yapısal ve sayısal anormallikler şeklinde gruplandırılmıştır (Paz-y-Miño ve ark., 2002). Fakat, bu çalışmada sadece pozitif kontrol uygulamalarında birkaç poliploidi şeklinde sayısal anormallik gözleendiğinden sayısal KA'lar değerlendirmeye alınmamıştır. Ayrıca çalışmamızda, gap (kromatidin birinde veya her ikisinde görülen boyanmamış bölge, bir kromatidin genişliğinden daha azdır) anormallik olarak değerlendirilmeye alınmamıştır (Preston ve ark., 1987). Yapısal KA'lar, Mosesso ve ark. (2013)'na göre kromatid ve kromozom tipi olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Çalışmamızda gözlenen kromatid tipi anormallikler kromatid kırığı, kardeş kromatid birleşmesive kromatid değişimi; kromozom tipi anormallikler ise kromozom kırığı, fragment ve disentrik kromozom gibi anormallikleri kapsamaktadır. İncelemeler sonunda belirlenen yapısal kromozom anormalliklerinden; yapısal KA taşıyan hücre %'si ve hücre başına düşen toplam KA frekansı hesaplanmıştır. Ayrıca, test maddeleri tarafından uyarılan toplam KA içindeki her bir çeşitteki yapısal KA'nın %'si hesaplanmıştır. Her bir çeşitteki KA %'si hesaplamalarında kontrol uygulamalarında gözlenen anormallikler dahil edilmemiştir.

PCE'nin hem tek başına hem de  $\alpha$ -tokoferol ile birlikte insan lenfositlerine uygulanmasının mitoz bölünme üzerine etkisini incelemek amacıyla MI değerleri saptanmıştır. MI'yı belirlemek için her bir hücre kültürüne ait preparatlarda toplam 2000 hücre (her konsantrasyon için toplam 8000 hücre) incelenmiştir. Her preparatta toplam 2000 hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranının yüzde cinsinden hesaplanması ile MI saptanmıştır.

#### **3.2.4.2. Mikronükleus Sayısı ve Nükleus Bölünme İndeksinin (NBI) Saptanması**

Sitokinez-bloklama MN yöntemiyle hazırlanan preparatlarda hem iki nükleuslu (binükleat, BN) hücreler içerisindeki MN sayısı belirlenmiş hem de toplam hücre

içerisindeki 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin sayısı belirlenerek nükleus bölünme indeksi (NBI) hesaplanmıştır.

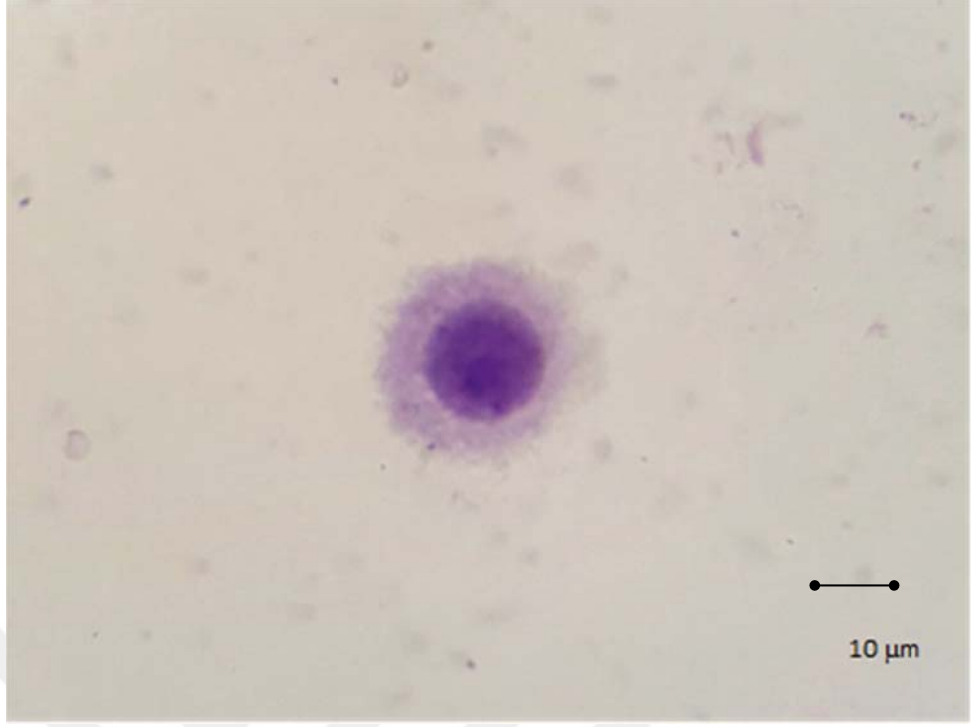
Bu çalışmada, MN sayısını belirlemek amacıyla dört kişiye ait daimi preparatlarda, her uygulama grubu ve kontrollerinde 1000 BN hücre (Şekil 3.4.) (her konsantrasyon için 4 kişiden toplam 4000 hücre) incelenmiştir. Değerlendirme, MN taşıyan iki nükleuslu hücre %'si ve toplam MN %'si hesaplanarak yapılmıştır.

İki nükleuslu hücre ve MN incelemeleri Titenko-Holland ve ark. (1997) ve Fenech (2000)'nin önerdikleri kriterlere uygun olarak yapılmıştır. Buna göre incelemede dikkat edilen kriterler şöyledir: (1) Hücrelerin sitoplazması belirgindir ve yuvarlak veya oval görünüme sahiptir; (2) Çekirdekler belirgin çekirdek zarıyla çevrilidir ve yuvarlak veya oval görünümündedir; (3) MN sayımı için kullanılan hücreler sadece BN hücrelerdir; (4) MN'ler sadece ana çekirdeğin 1/3'ü veya daha küçük olduklarında değerlendirmeye alınmıştır; (5) MN'ler ana çekirdek gibi boyanmıştır; (6) MN'ler ana çekirdekten belirgin olarak ayrılmıştır.

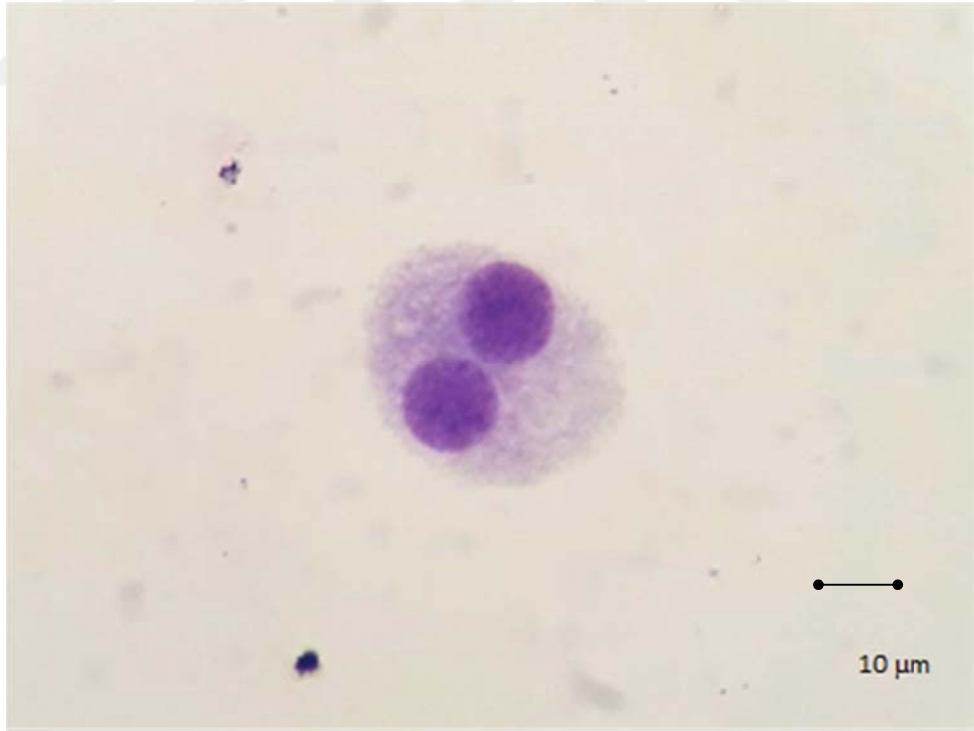
Test maddelerinin iki nükleuslu hücrelerde MN oluşumu üzerine etkisini belirlemek amacıyla incelenen preparatlar daha sonra NBI'yi hesaplayabilmek için tekrar incelenmiştir. Sitokalsin B kullanılarak sitokinezin bloklanması yoluyla yapılan MN yönteminde, bölünen hücre popülasyonundaki nükleus bölünmesinin ilerleyişi NBI'nin hesaplanmasıyla belirlenebilmektedir. NBI'nin belirlenmesi kimyasal veya fiziksel bir ajanın sitotoksik potansiyeli hakkında bilgiler sağlamaktadır (Fenech, 1997). Bu analizde, sitokalsin B ilavesinin ardından oluşan bir nükleuslu, iki nükleuslu ve multinükleuslu (>2) hücreler incelenmektedir. NBI, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Eastmond ve Tucker, 1989).

$$NBI = (MI + 2MII + 3 MIII + 4 MIV) / N$$

Formülde; MI bir nükleuslu (Şekil 3.3), MII iki nükleuslu (Şekil 3.4), MIII üç nükleuslu (Şekil 3.5), MIV dört nükleuslu (Şekil 3.6) hücrelerin sayısını, N ise toplam hücre sayısını göstermektedir. Bu çalışmada, NBI'yi hesaplamak için her preparatta toplam 1000 hücre (her konsantrasyon için toplam 4000 hücre) sayılmıştır.

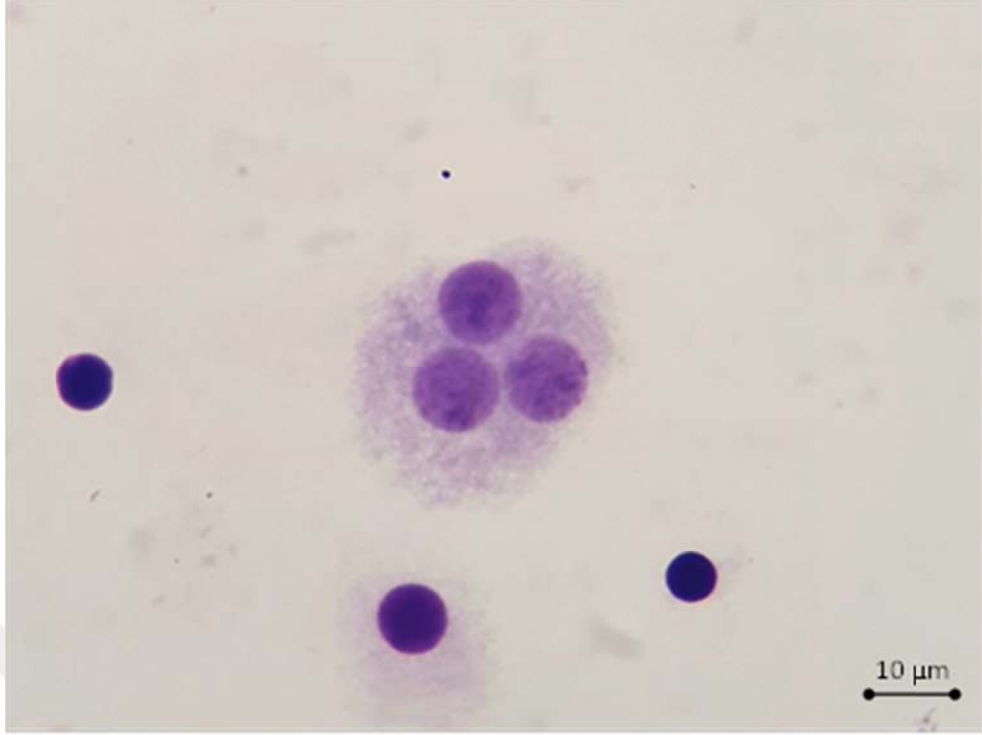


Şekil 3.3. Bir nükleuslu hücre (X1000)

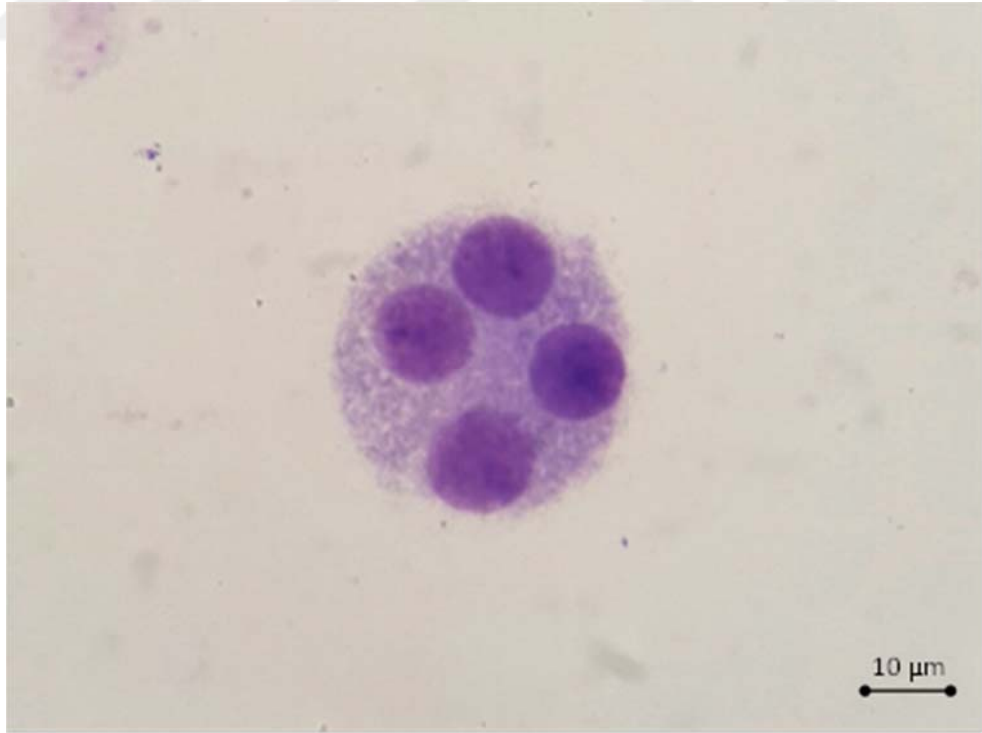


Şekil 3.4. İki nükleuslu hücre (X1000)





Şekil 3.5. Üç nükleuslu hücre (X1000)



Şekil 3.6. Dört nükleuslu hücre (X1000)

### 3.2.4.3.Redüksiyon Yüzdesi

Bu çalışmada genotoksik etkisi araştırılan madde olan PCE, insan lenfosit kültürlerine hem tek başına hem de antioksidan madde olarak bilinen  $\alpha$ -tokoferol ile kombinasyon halinde uygulanmıştır. Böylece,  $\alpha$ -tokoferolün PCE'nin genotoksik etkisi üzerine herhangi bir koruyucu yani antigenotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla, PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımının uygulanmasıyla meydana gelen sitogenetik etkide (total KA/hücre ve MN %'si bakımından), tek başına PCE uygulamasına göre azalma olup olmadığını veya ne kadar azalma olduğunu belirlemek için redüksiyon (azalma) yüzdesi değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamada aşağıdaki formül kullanılmıştır (Manoharan ve Banerjee, 1985; Waters ve ark., 1990).

$$\text{Redüksiyon (\%)} = \frac{A-B}{A-C} \times 100 \quad (3.1)$$

Formüle göre A, PCE'nin tek başına uygulandığı kültürlerde gözlenen ortalama değerleri; B, PCE ve  $\alpha$ -tokoferolün karışım halinde uygulamasında elde edilen ortalama değerleri; C ise kontrol (çözücü) sonuçlarının ortalamasını göstermektedir. Bu çalışmada redüksiyon %'si total KA/hücre ve MN %'si için hesaplanmıştır.

### 3.2.5. Mikroskopta Fotoğraf Çekimi

Fotoğraf çekme işlemi NIKON marka, Eclipse E200 model trinoküler mikroskopta 1000 X büyütmede yapılmıştır. Görüntüler, mikroskoba monte edilen bir aparat yardımıyla, 12 Megapiksel çözünürlüğe sahip Samsung Note 9 marka akıllı telefon kamerası kullanılarak elde edilmiştir.

### 3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz SPSS 11.5 for Windows kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılım gösterdiği Shapiro-Wilk normallik testi ile doğrulanmıştır. Gruplar arasındaki karşılaştırmada farkın önemli olup olmadığı ONE WAY ANOVA (Post Hoc analiz-LSD Test, Least Significant Difference) ile analiz edilmiştir. Ayrıca, tüm

parametreler için (CA, MN, MI ve NBI) konsantrasyon-etki ilişkisi olup olmadığı regresyon ve korelasyon analizi ile belirlenmiştir. Sonuçlar  $P < 0.05$  anlamlılık düzeyine göre istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.



## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Bulgular

#### 4.1.1. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositleri Üzerindeki Etkileri

##### 4.1.1.1. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormalliklerinin (KA) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada, 25, 50, 100 ve 150  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlardaki PCE ile 48 saat muamele edilen insan periferal kan lenfositlerinde, yapısal KA taşıyan hücre %'si ve hücre başına düşen toplam KA'nın (toplam KA/hücre), çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artış gösterdiği belirlenmiştir ( $P<0.001$ ). Ayrıca, PCE tarafından uyarılan KA'daki artışın,  $\alpha$ -tokoferol ile kıyaslandığında yine önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ( $P<0.001$ ). Bununla birlikte; çalışmamızda, PCE'nin KA oluşumunu pozitif kontrol olarak kullandığımız MMC kadar uyarıcı olmadığı görülmüştür. PCE tarafından uyarılan yapısal KA taşıyan hücre %'si ve toplam KA/hücre oranı tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole göre önemli derecede düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ) (Çizelge 4.1).

PCE uygulanan kültürlerdeki hem yapısal KA taşıyan hücre %'si ( $r^2= 0.876$ ,  $P<0.05$ ) (Şekil 4.1, Şekil 4.2) hem de total KA/hücre oranı ( $r^2=0.937$ ,  $P<0.05$ ) istatistiksel olarak önemli bir şekilde konsantrasyona bağlı artış göstermiştir (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Bu çalışmada, PCE'nin insan periferal kan lenfosit kültürlerinde özellikle yapısal KA'lara neden olduğu görülmüştür. Bu yapısal KA'lar kromatid ve kromozom tipi KA şeklinde gruplandırılmıştır. PCE'nin insan lenfositlerine 48 saat süreyle uygulanması sonucu gözlenen kromatid tipi yapısal KA'lar, kromatid kırığı (% 65.90) (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9), kardeş kromatid birleşmesi (% 16.13) (Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12) ve kromatid değişimi (% 2.76) (Şekil 4.13, Şekil 4.14)'dir. Kromozom tipi yapısal KA'lar ise kromozom kırığı (% 12.44) (Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17), fragment (% 1.84) (Şekil 4.18, Şekil 4.19 ) ve disentrik

kromozom (% 0.92) (Şekil 4.20)'dur. Bu çalışmada, PCE uygulanan kültürlerde poliploidi ve endoreduplikasyon gibi sayısal KA'lara rastlanmamıştır.

Çalışmamızın ikinci kısmında PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulamasının KA üzerine etkisi belirlenerek,  $\alpha$ -tokoferolün PCE tarafından indüklenen KA üzerine herhangi bir koruyucu/antigenotoksik etkisinin olup olmadığı değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla, PCE'nin tek başına uygulandığı konsantrasyonlar ile birlikte 100  $\mu$ g/ml konsantrasyondaki  $\alpha$ -tokoferol eş zamanlı olarak lenfosit kültürüne uygulanmıştır. Buna göre, PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımı ile 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde, yapısal KA %'si ve total KA/hücre oranı tüm konsantrasyonlarda (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) çözücü kontrol ve  $\alpha$ -tokoferole kıyasla istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P>0.05$ ). Ayrıca, PCE+ $\alpha$ -tokoferol tarafından uyarılan KA oluşumu, tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole göre önemli derecede düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Bunun yanında, PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımı ile muamele edilen kültürlerdeki yapısal KA %'si ve KA/hücre oranının tek başına PCE ile muamele edilen kültürlerdekine göre istatistiksel olarak önemli derecede azaldığı belirlenmiştir ( $P<0.001$ ). Bu azalmanın % olarak ne kadar olduğunu belirleyebilmek için, test edilen her konsantrasyonda, hücre başına düşen total KA bakımından redüksiyon (azalma) %'si değerleri hesaplanmıştır.

Redüksiyon yüzdesi değerlerine göre, PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımı ile (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) 48 saat muamele edilen kültürlerde hücre başına düşen KA frekansı, aynı konsantrasyondaki PCE'nin tek başına meydana getirdiği KA frekansına göresirasıyla % 67, % 89, % 90 ve % 77 oranlarında azalmıştır (Çizelge 4.1). Bu çalışmada, PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımının insan lenfositlerine 48 saat süreyle uygulanması sonucu dört tip yapısal KA'ya neden olduğu belirlenmiştir. Bunlar; kromatid kırığı (% 76.66), kardeş kromatid birleşmesi (% 7.83), kromozom kırığı (% 3.33) ve fragment (% 1.11) olarak gözlenmiştir. PCE'nin tek başına uygulandığı kültürlerde görülen kromatid değişimi ve disentrik kromozom gibi anormalliklere PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımının uygulandığı kültürlerde rastlanmamıştır. Ayrıca, PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulanan kültürlerde PCE'nin tek başına uygulandığı kültürlerde olduğu gibi poliploidi ve endoreduplikasyon gibi sayısal KA'lara da rastlanmamıştır.

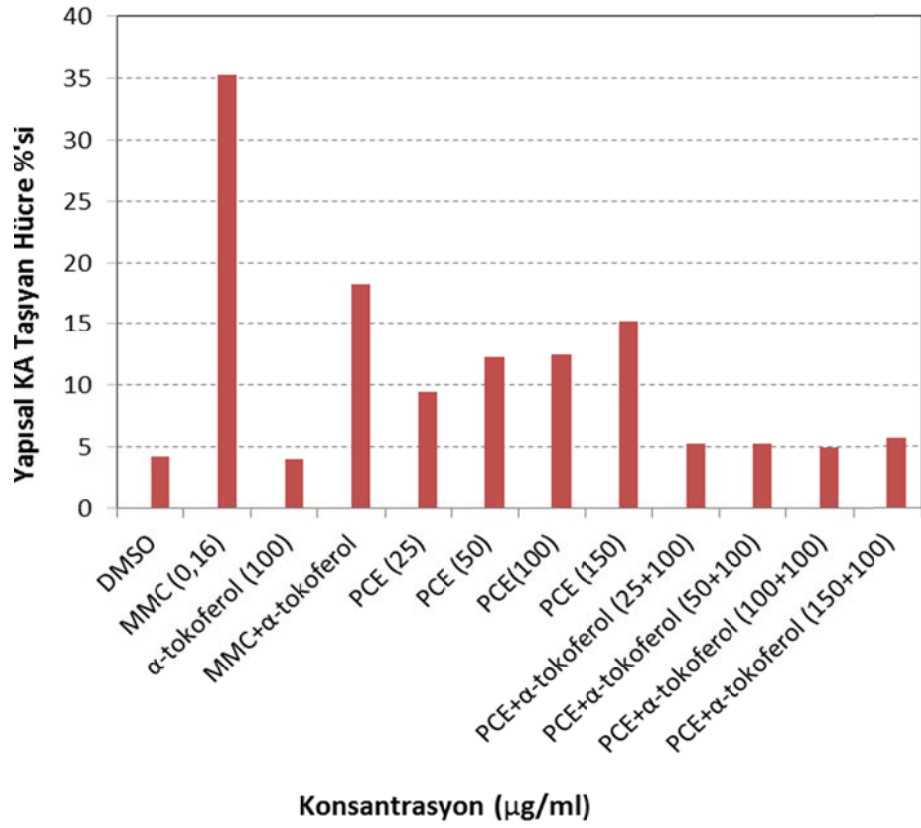
Çizelge 4.1.PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulamasının insan periferel lenfositlerinde kromozom anormallikleri üzerine etkisi

Test Maddesi	Uygulama		Kromozomal Anormallikler (KA)						Toplam KA	Yapısal KA Taşıyan Hücre %'si $\pm$ SH	Toplam KA/Hücre $\pm$ SH	Redüksiyon %'si
	Süre (saat)	Kons. ( $\mu$ g/ml)	Yapısal KA			Kromozom Tipi						
			Kromatid Tipi			Kromozom Tipi						
B'	KKB	KD	B''	F	DS							
DMSO	48	7 $\mu$ l/ml	14	2	0	1	0	0	17	4.25 $\pm$ 0.96	0.04 $\pm$ 0.01	
$\alpha$ -tokoferol	48	100	12	4	0	0	0	0	16	4.00 $\pm$ 0.82	0.04 $\pm$ 0.01	
MMC	48	0.16	58	6	56	46	3	1	170	35.25 $\pm$ 4.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	0.43 $\pm$ 0.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	
MMC+ $\alpha$ -tokoferol		0.16+100	38	2	11	29	0	0	80	18.25 $\pm$ 3.30 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	0.20 $\pm$ 0.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
PCE	48	25	32	3	1	2	2	0	40	9.50 $\pm$ 1.73 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	0.10 $\pm$ 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
		50	37	10	1	4	0	0	52	12.25 $\pm$ 1.71 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	0.13 $\pm$ 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
		100	35	10	2	9	1	0	57	12.50 $\pm$ 2.65 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	0.14 $\pm$ 0.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
		150	39	12	2	12	1	2	68	15.25 $\pm$ 1.71 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	0.17 $\pm$ 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
PCE+ $\alpha$ -tokoferol	48	25+100	17	5	0	0	0	0	22	5.25 $\pm$ 0.96 c <sub>3</sub> d <sub>2</sub>	0.06 $\pm$ 0.01 c <sub>3</sub> d <sub>2</sub>	67
		50+100	14	6	0	0	1	0	21	5.25 $\pm$ 0.50 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	0.05 $\pm$ 0.01 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	89
		100+100	17	3	0	1	0	0	21	5.00 $\pm$ 0.82 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	0.05 $\pm$ 0.01 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	90
		150+100	21	3	0	2	0	0	26	5.75 $\pm$ 0.50 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	0.07 $\pm$ 0.01 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	77

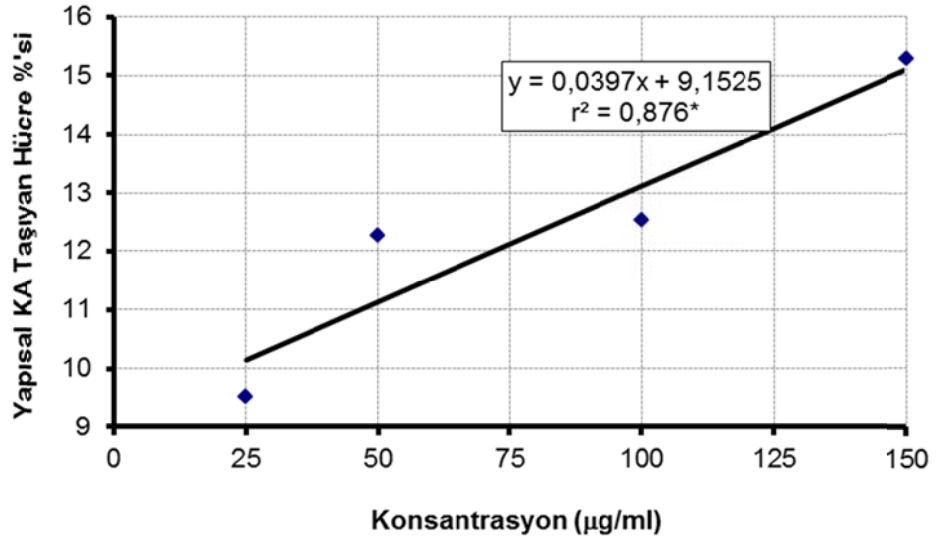
B': Kromatid kırığı, KKB: Kardeş kromatid birleşmesi, KD: Kromatid değişimi, B'': Kromozom kırığı, F: Fragment, DS: Disentrik kromozom, DMSO: Dimetilsülfoksit (Çözücü kontrol), MMC: Mitomisin-C (Pozitif kontrol), PCE: Perkloretilen

a: Çözücü kontrol ile, b:  $\alpha$ -tokoferol ile, c: Pozitif kontrol ile, d: PCE ile kıyaslamada aradaki fark önemlidir.

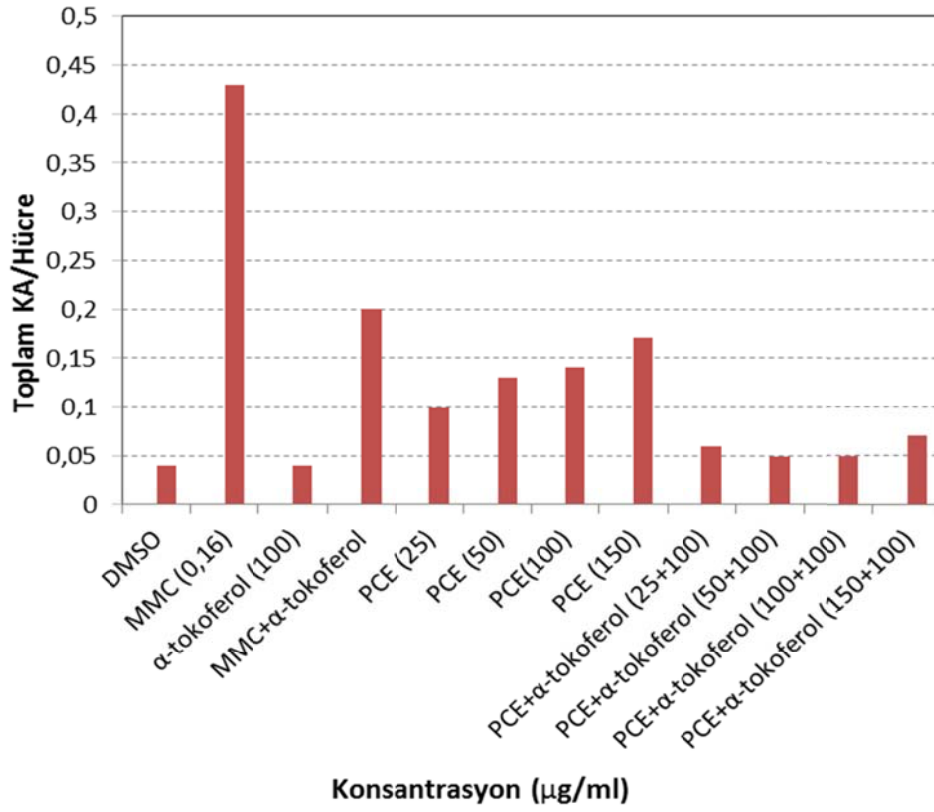
a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>d<sub>1</sub>: P $\leq$ 0.05, a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>d<sub>2</sub>: P $\leq$ 0.01, a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>d<sub>3</sub>: P $\leq$ 0.001



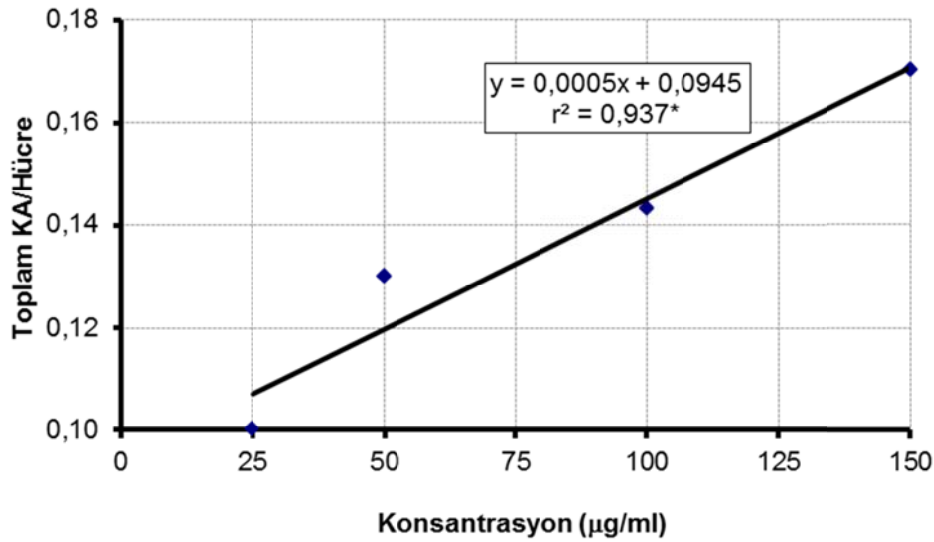
Şekil 4.1. Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde yapısal KA taşıyan hücre yüzdesi.



Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda PCE ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Yapısal KA taşıyan hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. \*:  $P < 0.05$

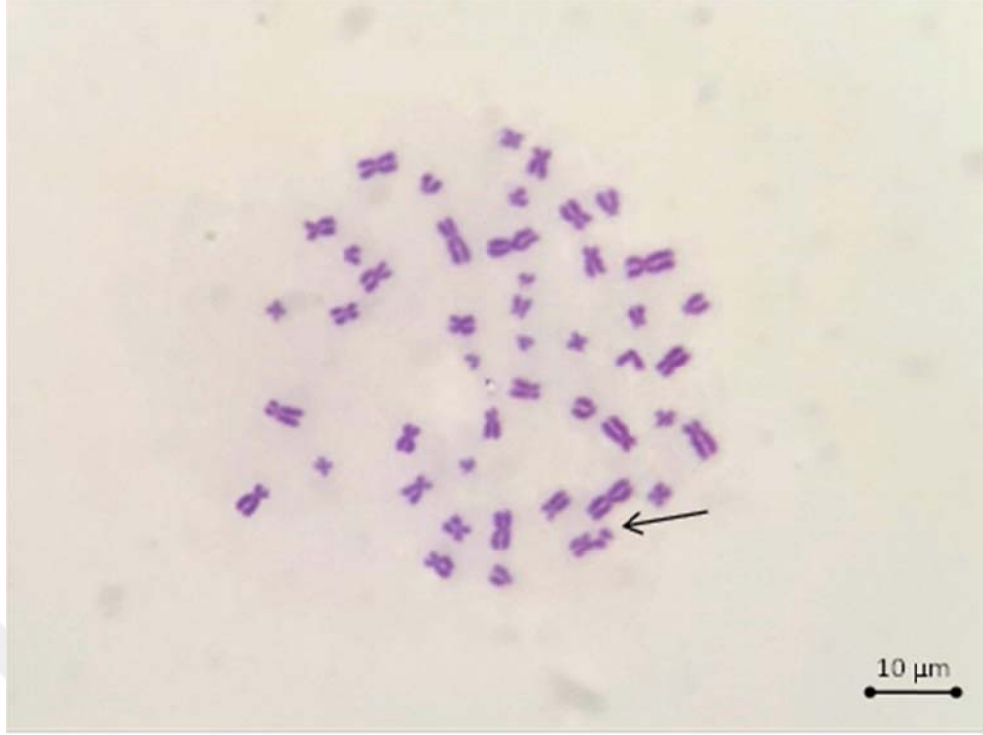


Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Toplam KA/Hücre oranı.

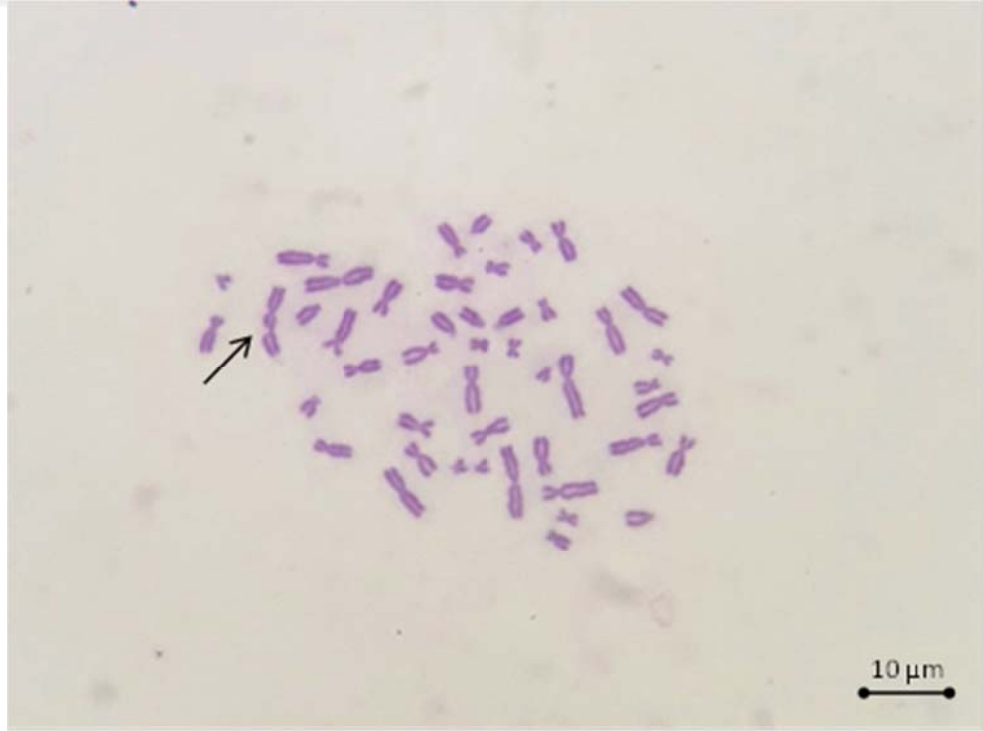


Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlarda PCE ile muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde Toplam KA/hücre frekansının konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. \*: P<0.05

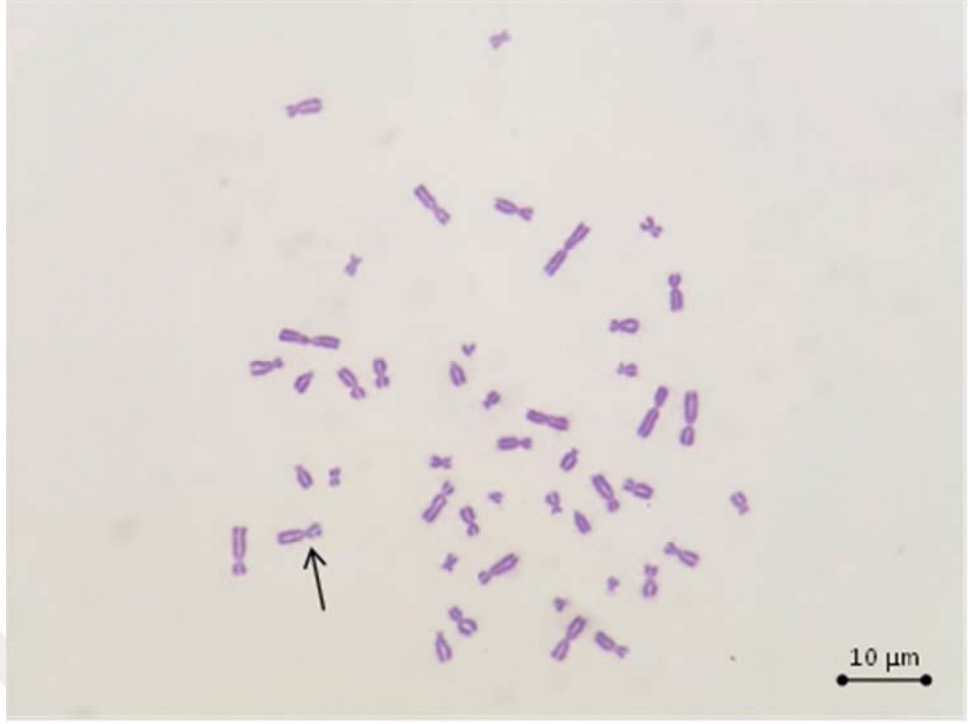




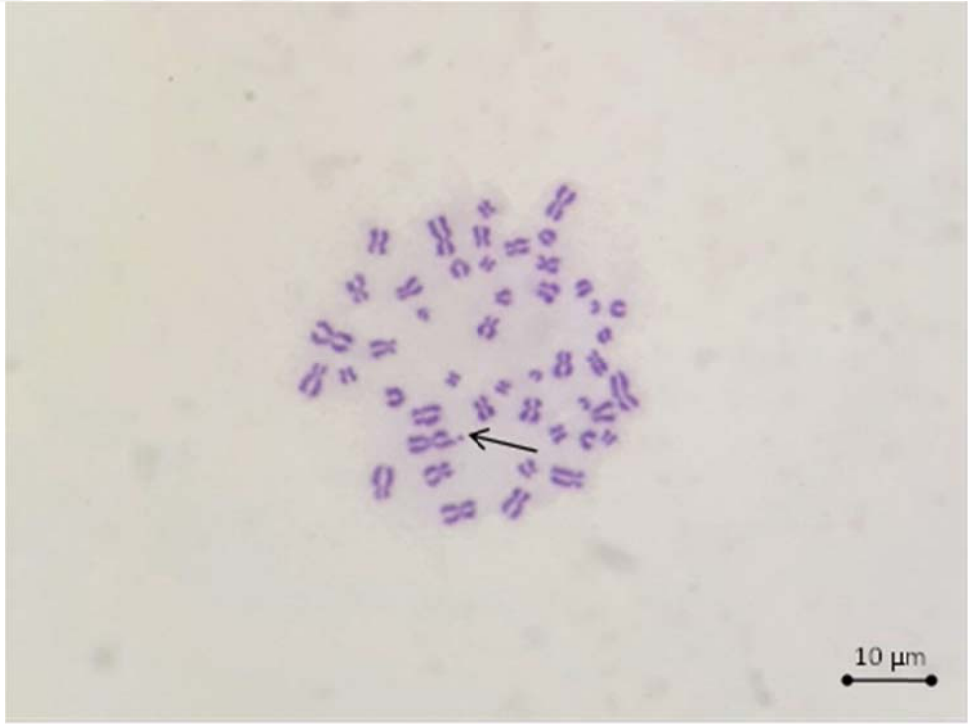
Şekil 4.5. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (25 µg/ml, perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



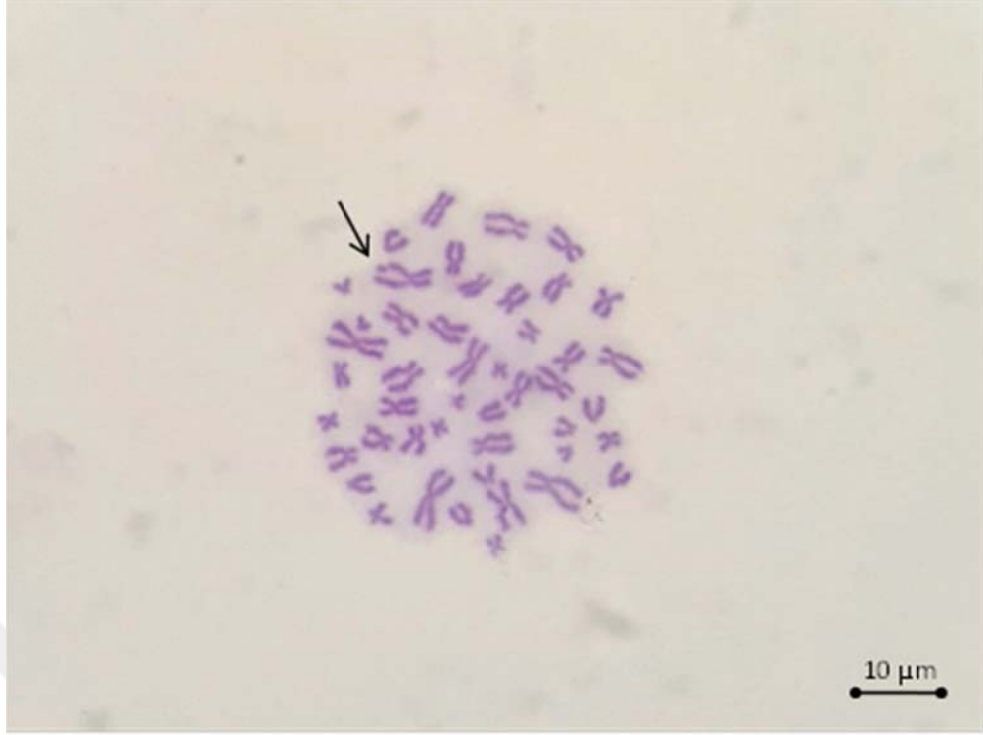
Şekil 4.6. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



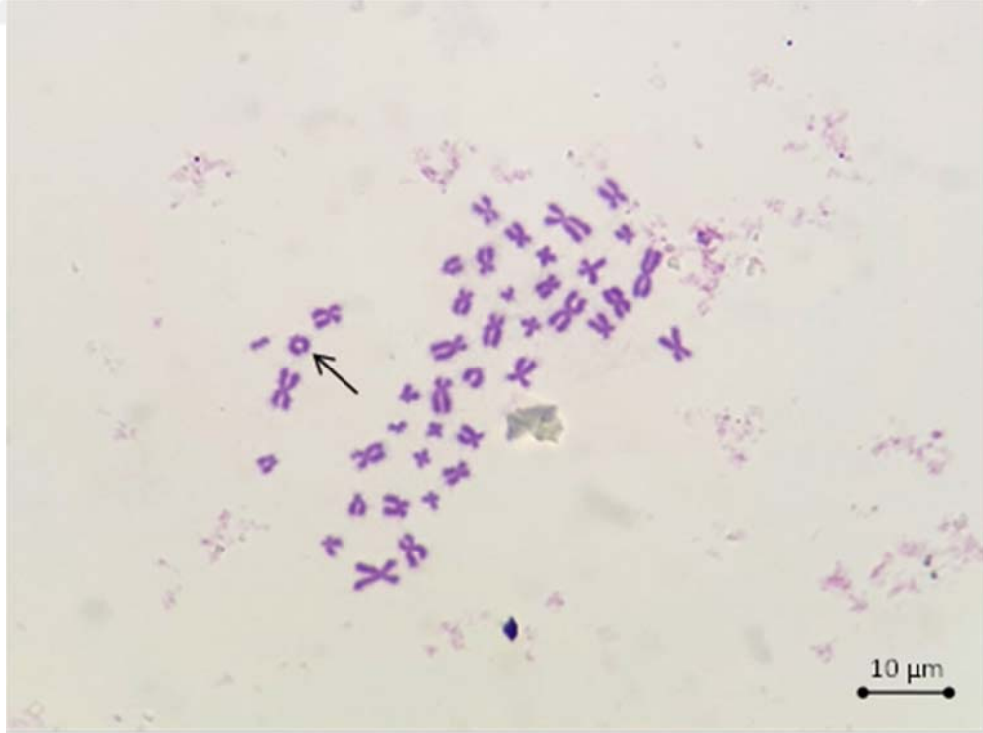
Şekil 4.7. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



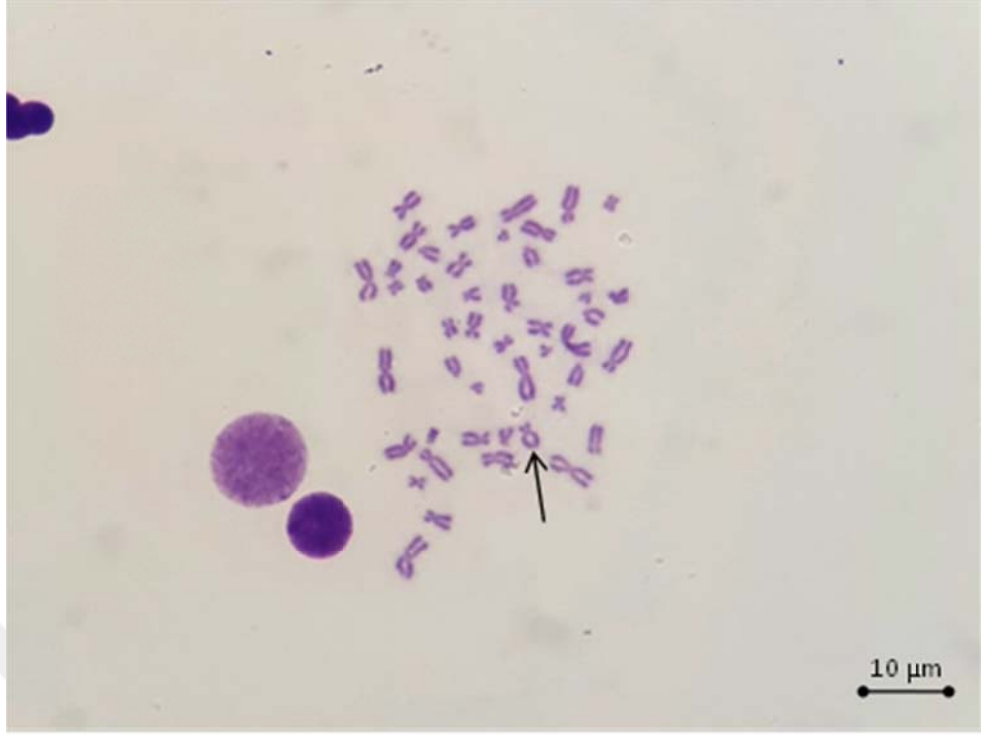
Şekil 4.8. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (25 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



Şekil 4.9. Kromatid kırığı (B') bulunan metafaz plağı (50 µg/ml perkloretilen uygulaması, ♀). X1000



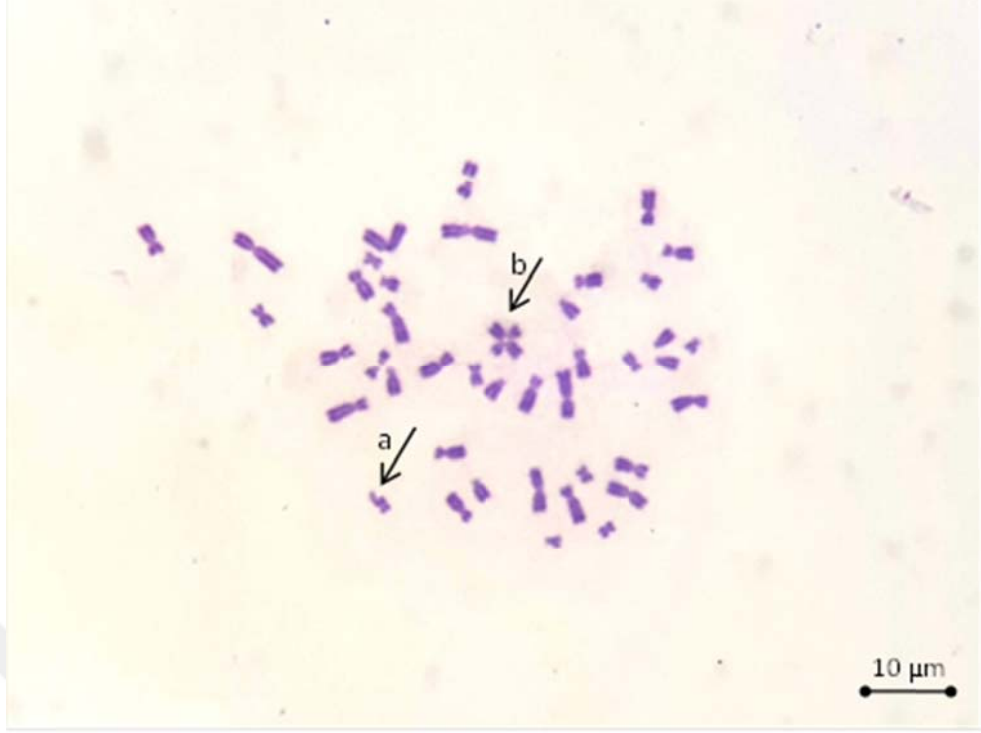
Şekil 4.10. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



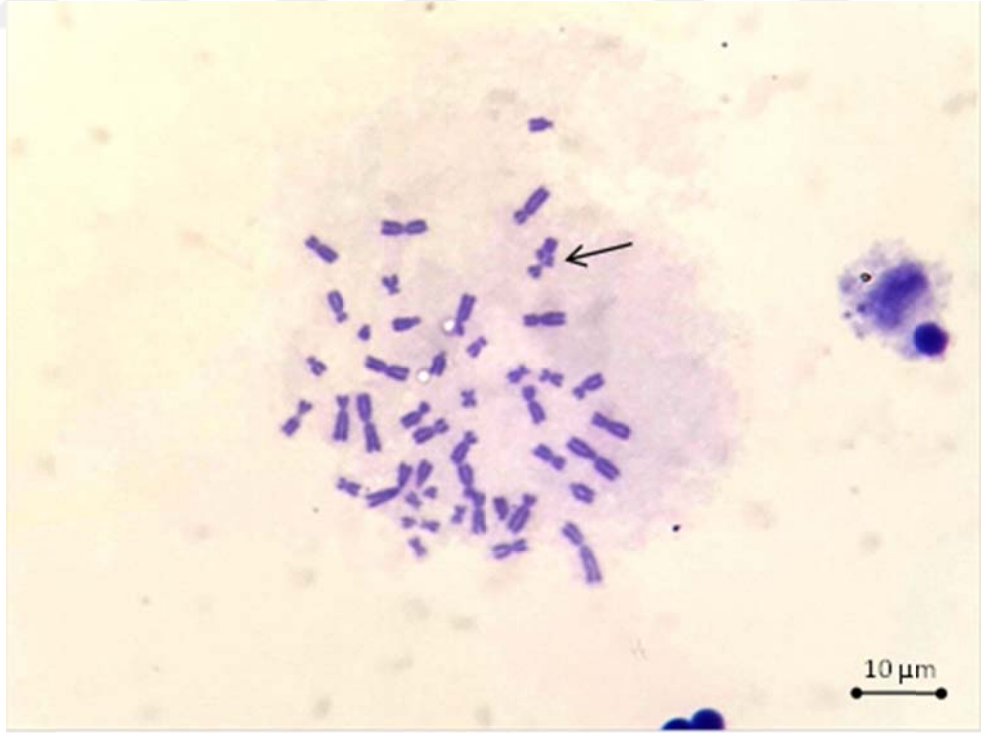
Şekil 4.11. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.12. Kardeş Kromatid Birleşmesi (KKB) bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



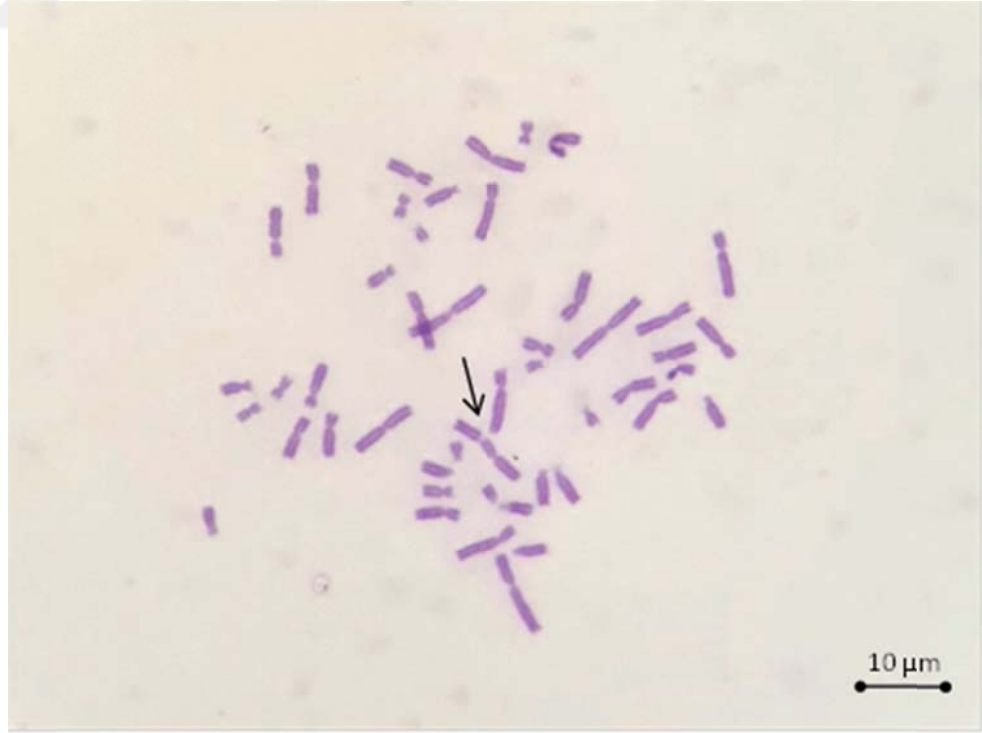
Şekil 4.13. (a) Kromatid kırığı (B'), (b) kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (150 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.14. Kromatid değişimi (KD) bulunan metafaz plağı (100 µg/ml PCE uygulaması, ♂). X1000



Şekil 4.15. (a) Kromatid kırığı (B'), (b) kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



Şekil 4.16. Kromozom kırığı (B'') bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000





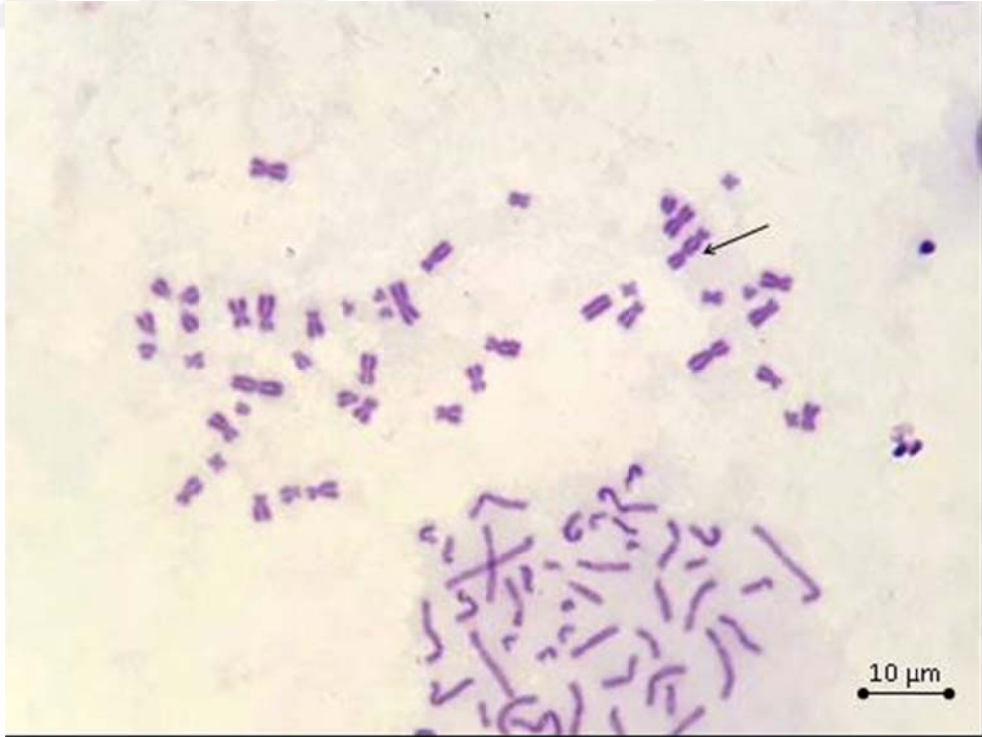
Şekil 4.17. Kromozom kırığı (B") bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



Şekil 4.18. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.19. Fragment (F) bulunan metafaz plağı (150 μg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.20. Disentrik kromozom (DS) bulunan metafaz plağı (150 μg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



#### 4.1.1.2. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulamasının insan periferal kan lenfositlerinde MN oluşumu üzerindeki etkileri Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

PCE’nin tek başına uygulandığı insan periferal lenfositlerindeki MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesi (% MNBN) ve MN yüzdesi (% MN) tüm konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 150  $\mu$ g/ml) çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli derecede artmıştır ( $P<0.05$ ). PCE’nin uyardığı MN oluşumundaki bu artış, en düşük konsantrasyon hariç (25  $\mu$ g/ml) olmak üzere  $\alpha$ -tokoferole göre de önemli bulunmuştur ( $P<0.05$ ). Bununla birlikte, PCE uygulaması, insan lenfositlerindeki MN oluşumunu pozitif kontrol kadar uyaramamış ve tüm konsantrasyonlarda MMC’ye göre önemli derecede düşük bulunmuştur ( $P<0.001$ ) (Çizelge 4.2).

PCE ile 48 saat muamele edilen kültürlerdeki MNBN hücre %’si konsantrasyona bağlı olarak artış göstermiş olup, bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $r^2=0.999$ ,  $P<0.01$ ) (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Benzer şekilde, MN %’si bakımından da, istatistiksel olarak önemli konsantrasyon-etki ilişkisi olduğu belirlenmiştir ( $r^2=0.993$ ,  $P<0.01$ ) (Şekil 4.23, Şekil 4.24).

$\alpha$ -Tokoferolün PCE tarafından indüklenen MN üzerine antigenotoksik etkisinin olup olmadığını belirlemeye çalıştığımız ikinci kısımda ise; PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımı ile 48 saat muamele edilen insan periferal lenfositlerinde, MNBN %’si ve MN %’si tüm konsantrasyonlarda (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) hem çözücü kontrol hem de  $\alpha$ -tokoferole göre istatistiksel olarak önemli bir değişikliğe neden olmamıştır ( $P>0.05$ ). Ayrıca, PCE ve  $\alpha$ -tokoferolün eş zamanlı olarak birlikte uygulandığı kültürlerdeki MN oluşumunun, tüm konsantrasyonlarda (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) pozitif kontrole göre önemli derecede düşük olduğu belirlenmiştir ( $P<0.001$ ).

Bunun yanında, PCE+ $\alpha$ -tokoferol karışımı ile muamele edilen kültürlerdeki MNBN %’si ve MN %’si, aynı konsantrasyondaki PCE ile tek başına muamele edilen kültürlerdekine göre azalmış olup, MN oluşumundaki bu azalmalar en düşük konsantrasyon hariç (25+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol için  $P>0.05$ ) diğer yüksek üç

konsantrasyonda istatistiksel olarak önemli derecede olmuştur (50+100 µg/ml; PCE+α-tokoferol için  $P<0.05$ ; 100+100 ve 150+100 µg/ml; PCE+α-tokoferol için  $P<0.001$ ).

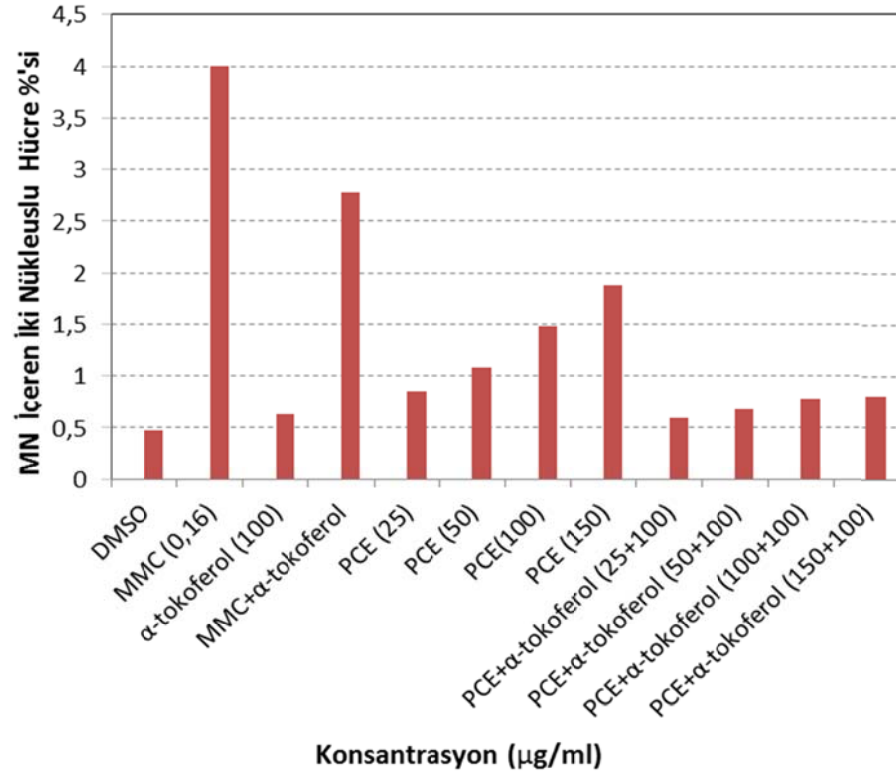
Redüksiyon yüzdesi değerlerine göre, PCE+α-tokoferol karışımı ile (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100 µg/ml; PCE+α-tokoferol) 48 saat muamele edilen kültürlerde MN %'si, aynı konsantrasyondaki PCE'nin tek başına meydana getirdiği MN %'sine göre sırasıyla % 70, 67, 68 ve 77 oranlarında azalmıştır (Çizelge 4.2).

Bu çalışmada, PCE ve PCE+α-tokoferol uygulamaları iki nükleuslu hücrelerde değişik büyüklük ve sayılarda MN oluşumlarına neden olmuştur (Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27, Şekil 4.28, Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32).

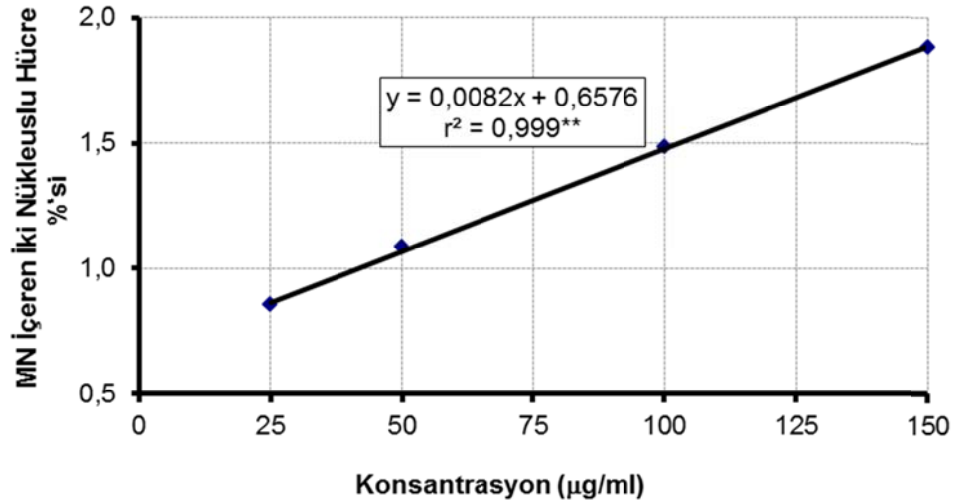
Çizelge 4.2. PCE ve PCE+α-tokoferol uygulamasının insan periferik lenfositlerinde mikronükleus oluşumu üzerine etkisi

Test Maddesi	Uygulama		MN Sayısına Göre İki Nükleuslu Hücre Sayısı			MN İçeren İki Nükleuslu Hücre %'si ± SH	% MN ± SH	Redüksiyon %'si
	Süre (saat)	Kons. (µg/ml)	0	1	2			
DMSO	48	7 µl/ml	3981	19	0	0.48 ± 0.05	0.48 ± 0.05	
α-tokoferol	48	100	3975	25	0	0.63 ± 0.17	0.63 ± 0.17	
MMC MMC+ α-tokoferol	48	0.16 0.16+100	3840 3889	148 110	12 1	4.00 ± 0.42 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> 2.78 ± 0.43 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	4.30 ± 0.47 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> 2.80 ± 0.43 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
PCE	48	25	3966	33	1	0.85 ± 0.06 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>	0.88 ± 0.10 a <sub>1</sub> c <sub>3</sub>	
		50	3957	43	0	1.08 ± 0.15 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>	1.08 ± 0.15 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>	
		100	3941	59	0	1.48 ± 0.24 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	1.48 ± 0.24 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
		150	3925	69	6	1.88 ± 0.56 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	2.03 ± 0.42 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>	
PCE+ α-tokoferol	48	25+100	3976	24	0	0.60 ± 0.08 c <sub>3</sub>	0.60 ± 0.08 c <sub>3</sub>	70
		50+100	3973	27	0	0.68 ± 0.10 c <sub>3</sub> d <sub>1</sub>	0.68 ± 0.10 c <sub>3</sub> d <sub>1</sub>	67
		100+100	3969	30	1	0.78 ± 0.15 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	0.80 ± 0.18 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	68
		150+100	3968	31	1	0.80 ± 0.08 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	0.83 ± 0.10 c <sub>3</sub> d <sub>3</sub>	77

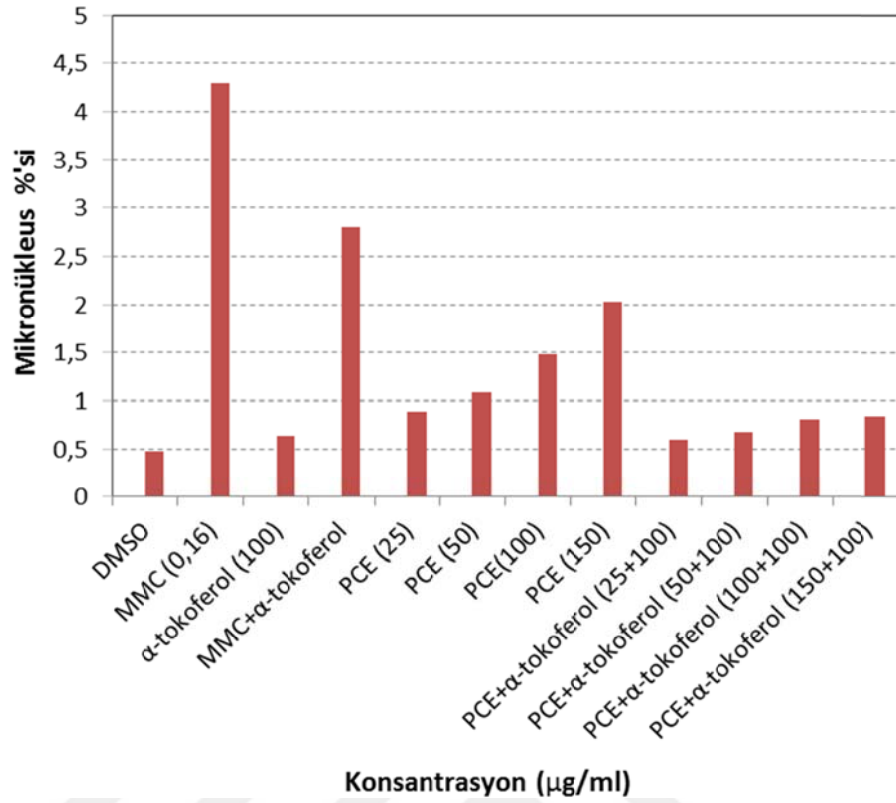
DMSO: Dimetilsülfoksit (Çözücü kontrol), MMC: Mitomisin-C (Pozitif kontrol), PCE: Perkloretilen  
a: Çözücü kontrol ile, b: α-tokoferol ile, c: Pozitif kontrol ile, d: PCE ile kıyaslamada aradaki fark önemlidir. a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>d<sub>1</sub>:  $P<0.05$ , a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>d<sub>2</sub>:  $P<0.01$ , a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>d<sub>3</sub>:  $P<0.001$



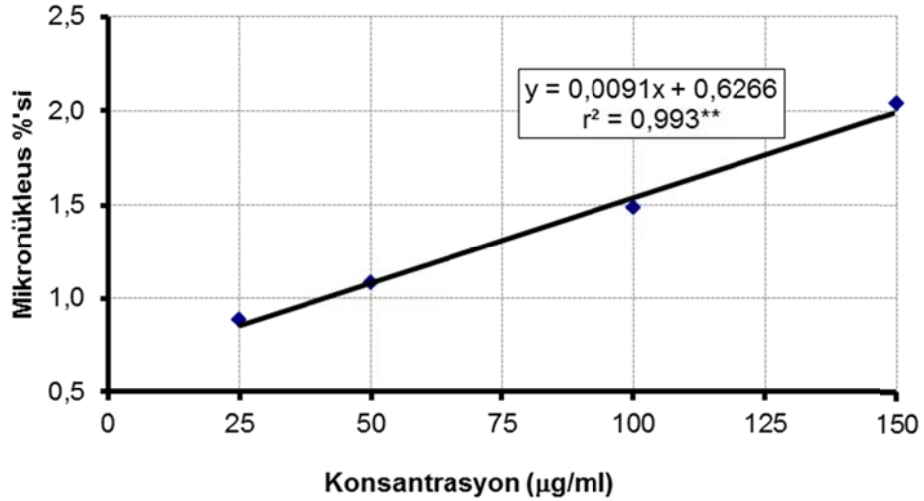
Şekil 4.21. Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre yüzdesi.



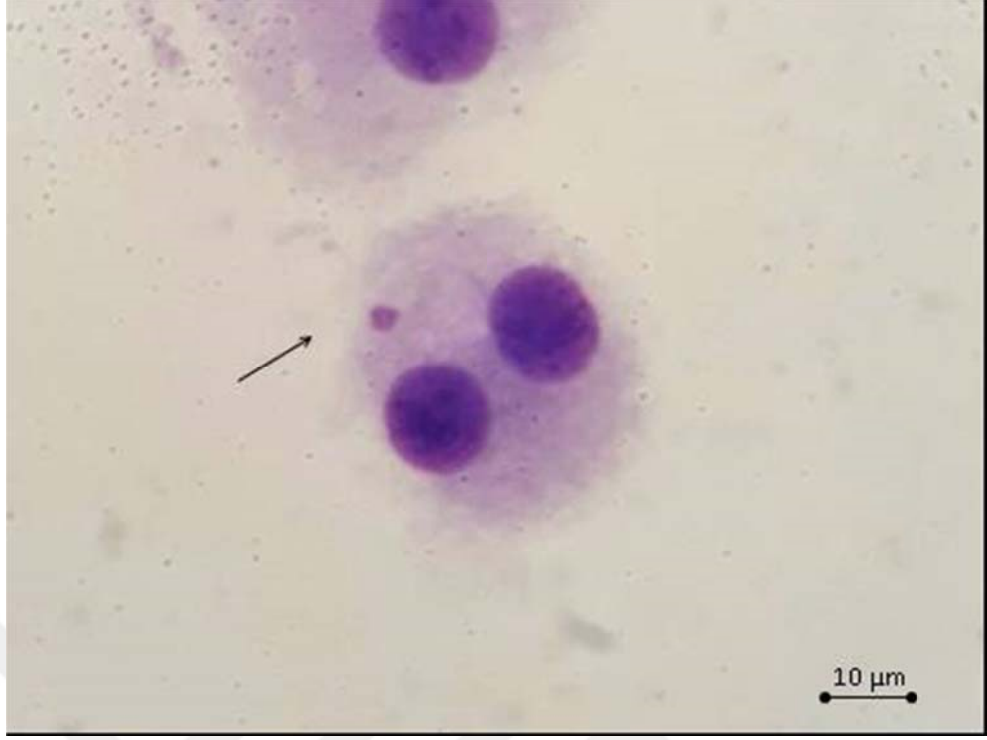
Şekil 4.22. Farklı konsantrasyonlarda PCE ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde MN içeren iki nükleuslu hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. \*\*: P<0.01



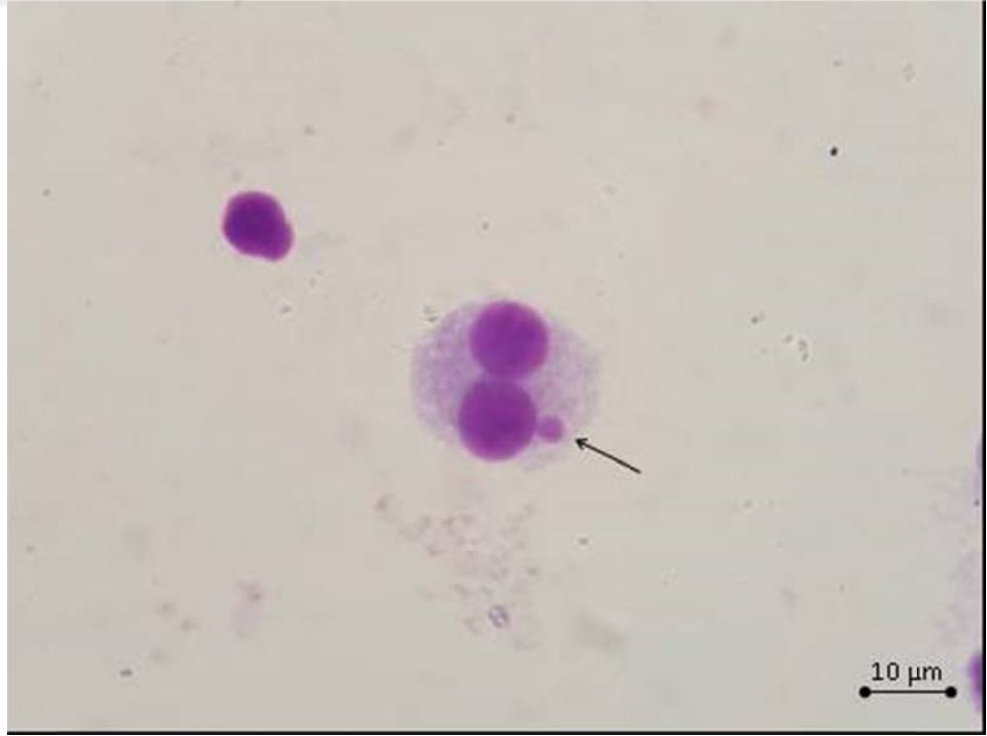
Şekil 4.23. Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN %'si.



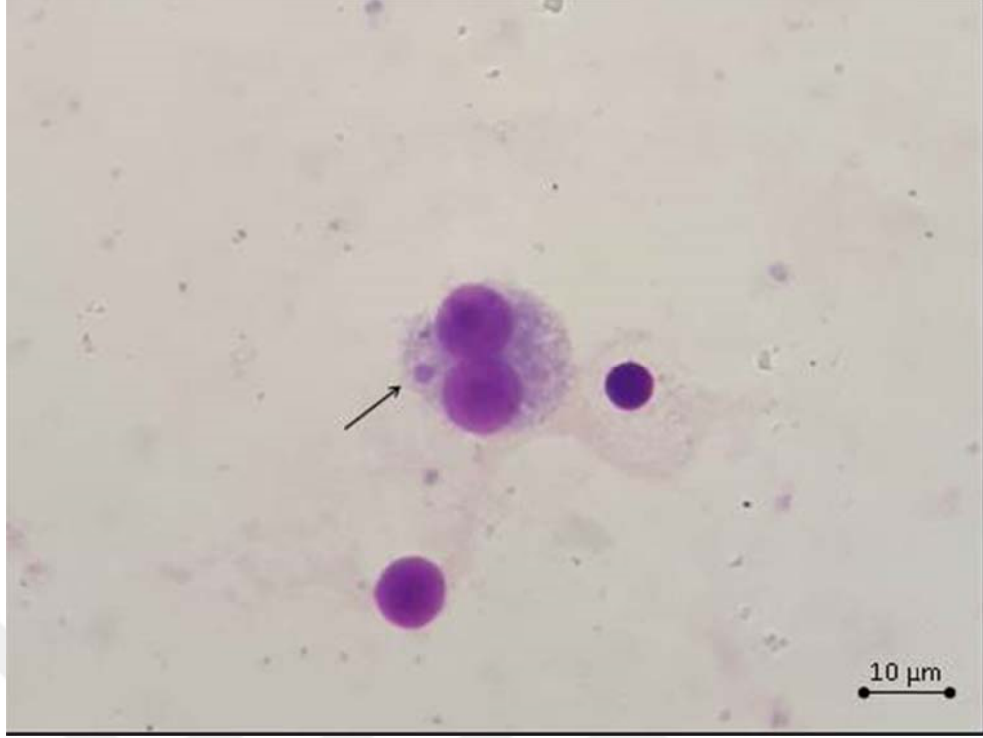
Şekil 4.24. Farklı konsantrasyonlarda PCE ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde MN içeren hücre %'sinin konsantrasyona bağlı artışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. \*\*: P<0.001



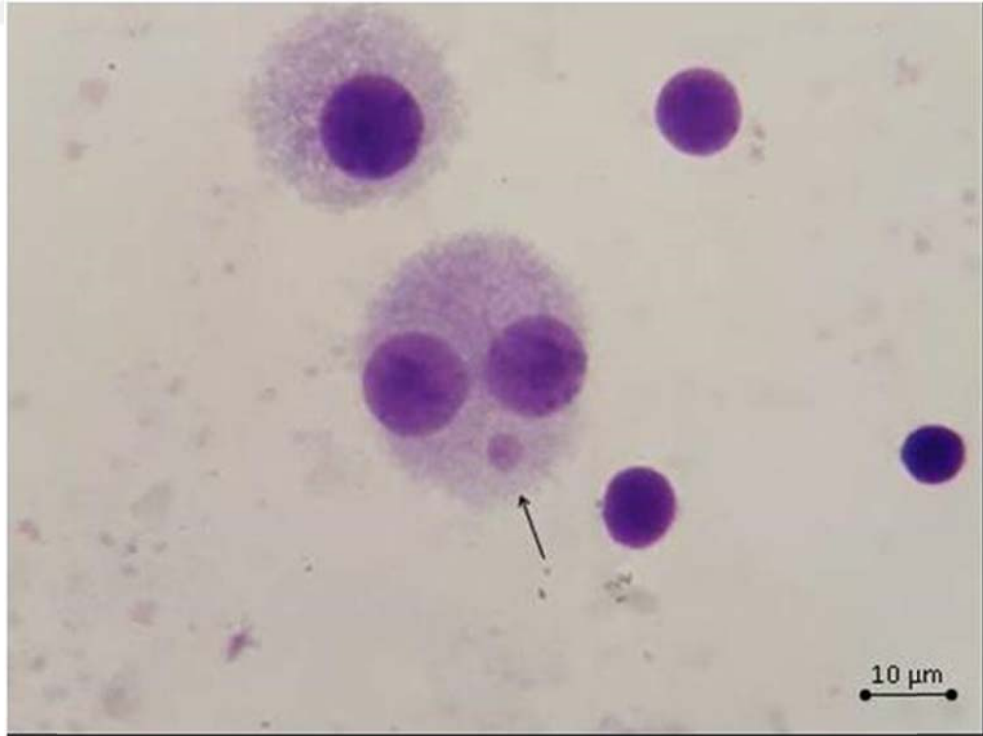
Şekil 4.25. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (25 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



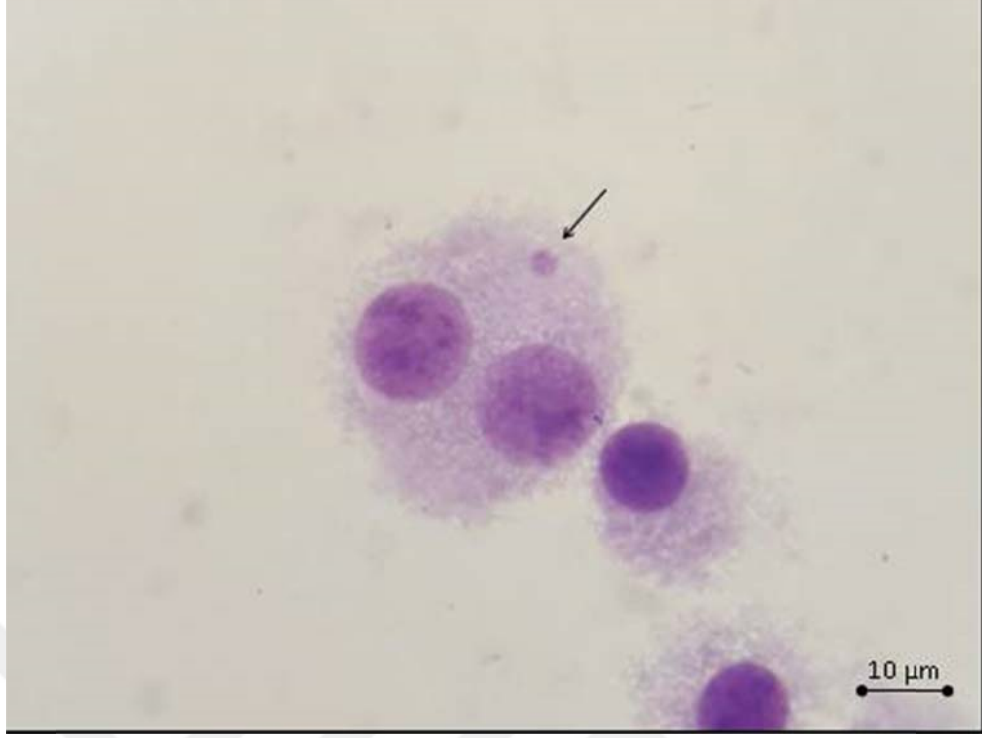
Şekil 4.26. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



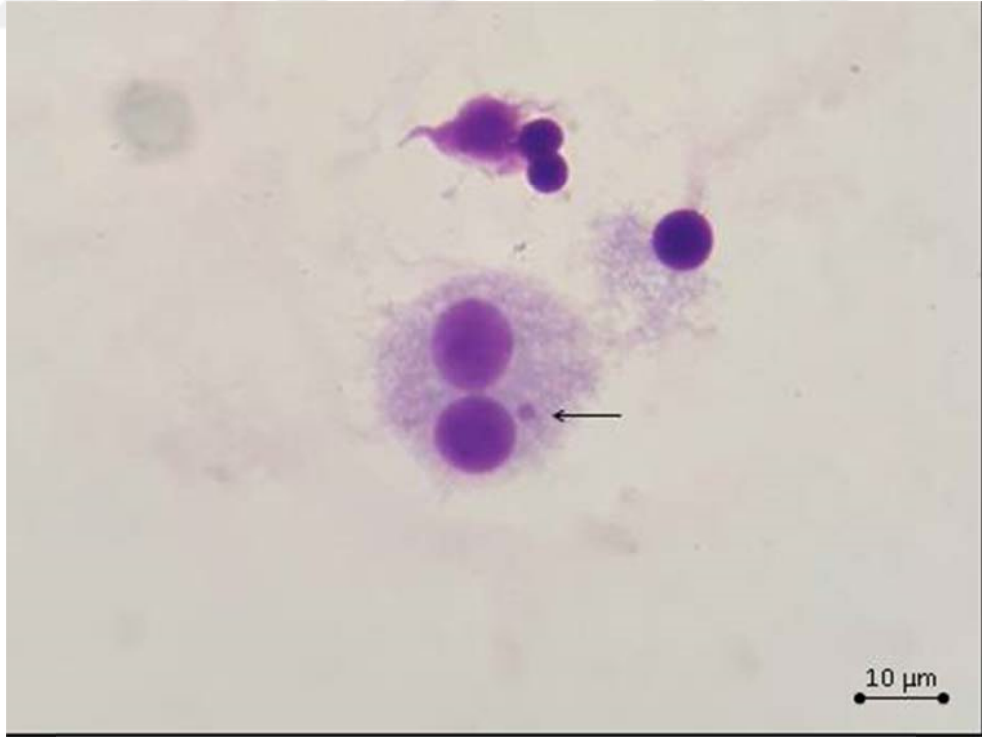
Şekil 4.27. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml perkloretilen+100 µg/ml  $\alpha$ -tokoferol, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.28. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



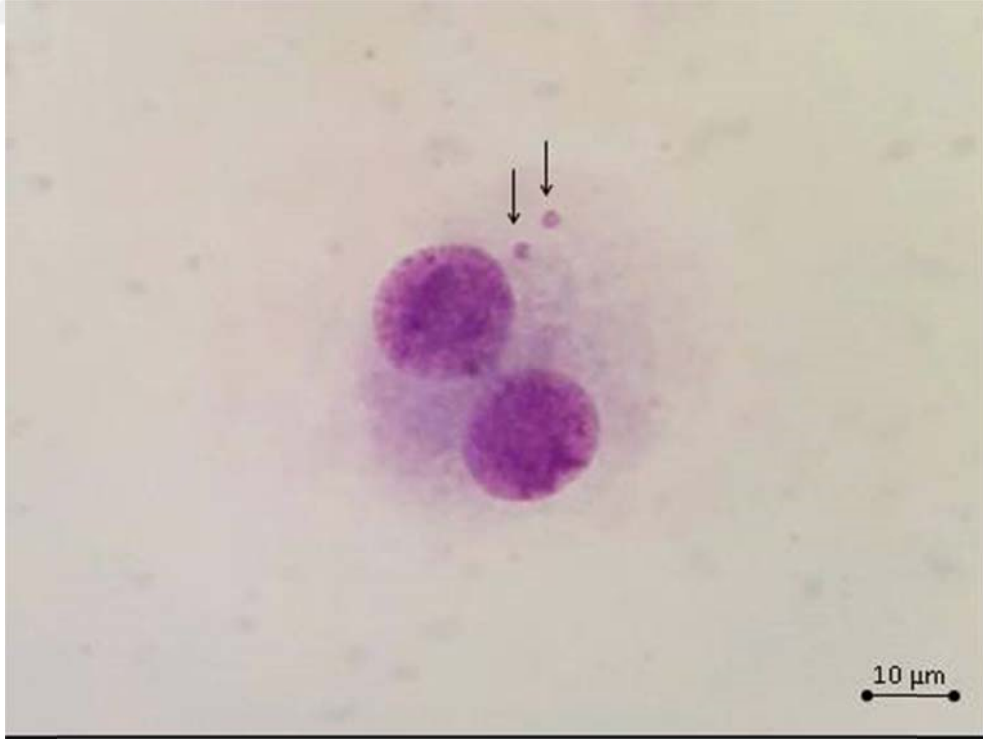
Şekil 4.29. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (50 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.30. Mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml perkloretilen+100 µg/ml α-tokoferol, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.31. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (100 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♂). X1000



Şekil 4.32. İki mikronükleus içeren iki nükleuslu hücre (150 µg/ml perkloretilen, 48 saat uygulama, ♀). X1000



#### 4.1.1.3. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Mitotik indeks (MI) Üzerine Etkileri

PCE'nin insan periferal kan lenfositleri üzerindeki olası sitotoksik etkilerini değerlendirmek amacıyla mitotik indeks (MI) değerleri belirlenmiştir. Çalışmamızda, PCE'nin insan periferal kan lenfositlerine 48 saat süre ile uygulanması sonucu elde edilen MI değerleri, en düşük konsantrasyon hariç (25  $\mu$ g/ml) diğer tüm konsantrasyonlarda (50, 100 ve 150  $\mu$ g/ml) hem çözücü kontrol hem de  $\alpha$ -tokoferole göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunarak ( $P < 0.001$ ) sitotoksik etki göstermiştir. Ayrıca, Çizelge 4.3'te görülebileceği gibi 25 ve 50  $\mu$ g/ml'lik konsantrasyonlarındaki PCE'nin insan lenfositlerine uygulanması, pozitif kontrolün neden olduğu sitotoksiste kadar etkili olmasa da; yüksek iki konsantrasyondaki PCE (100 ve 150  $\mu$ g/ml) uygulaması MI'yı pozitif kontrol kadar düşürmüştür (Çizelge 4.3).

PCE uygulanan kültürlerdeki MI değerleri istatistiksel olarak önemli bir şekilde konsantrasyona bağlı olarak düşmüştür ( $r^2 = 0.942$ ,  $P < 0.05$ ) (Şekil 4.33, Şekil 4.34).

Çalışmamızda, PCE tarafında indüklenen sitotoksiste üzerine,  $\alpha$ -tokoferolün herhangi bir antisitotoksik etkisinin olup olmadığını belirleyebilmek için her iki madde (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) eş zamanlı olarak kültürlerle uygulanarak MI değerleri hesaplanmıştır. Buna göre; PCE'nin tek başına uygulandığı kültürlerde olduğu gibi, en düşük PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulaması hariç diğer tüm konsantrasyonlardaki (50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) MI değerleri hem çözücü kontrol hem de  $\alpha$ -tokoferole göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulunmuştur ( $P < 0.05$ ). Ancak bu etki pozitif kontrol kadar olmamıştır (150+100  $\mu$ g/ml; PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulaması hariç).

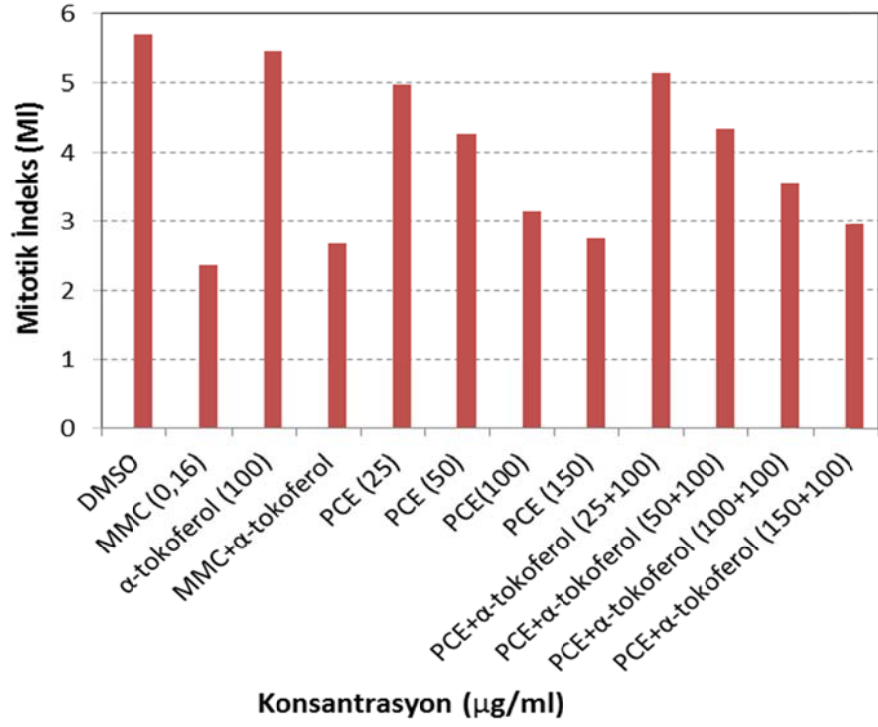
PCE'nin 48 saat süre ile tek başına uygulandığı kültürlerle kıyasla aynı konsantrasyonlardaki PCE ve 100  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -tokoferolün eş zamanlı olarak karışım şeklinde uygulandığı kültürlerdeki MI değerleri genel olarak yükselmiş, fakat bu artışların hiçbiri istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $P > 0.05$ ) (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulamasının insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks (MI) ve nükleus bölünme indeksi (NBI) üzerine etkileri

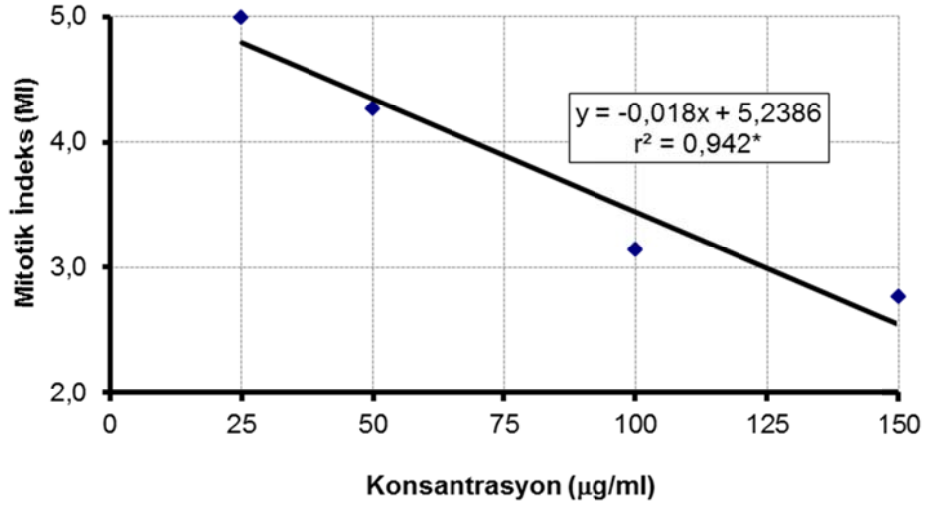
Test Maddesi	Uygulama		MI $\pm$ SH	Nükleus Sayısına Göre Hücrelerin Dağılımı				NBI $\pm$ SH
	Süre (saat)	Kons. ( $\mu$ g/ml)		1	2	3	4	
DMSO	48	7 $\mu$ l/ml	5.69 $\pm$ 0.90	1402	571	20	7	1.32 $\pm$ 0.10
$\alpha$ -tokoferol	48	100	5.46 $\pm$ 0.69	1461	501	28	10	1.29 $\pm$ 0.03
MMC	48	0.16	2.36 $\pm$ 0.58 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	1864	133	3	0	1.07 $\pm$ 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>
MMC+ $\alpha$ -tokoferol	48	0.16+100	2.67 $\pm$ 0.38 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	1775	217	6	2	1.12 $\pm$ 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>2</sub>
PCE	48	25	4.98 $\pm$ 0.83 c <sub>3</sub>	1468	527	3	2	1.27 $\pm$ 0.04 a <sub>2</sub> c <sub>3</sub>
		50	4.26 $\pm$ 0.67 a <sub>2</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>	1577	417	4	2	1.21 $\pm$ 0.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>
		100	3.13 $\pm$ 1.12 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	1585	412	2	1	1.21 $\pm$ 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>
		150	2.75 $\pm$ 0.92 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	1649	349	2	0	1.18 $\pm$ 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>
PCE+ $\alpha$ -tokoferol	48	25+100	5.13 $\pm$ 0.59 c <sub>3</sub>	1526	461	8	5	1.25 $\pm$ 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>2</sub> c <sub>3</sub>
		50+100	4.34 $\pm$ 0.68 a <sub>1</sub> b <sub>1</sub> c <sub>3</sub>	1557	434	7	2	1.23 $\pm$ 0.01 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>
		100+100	3.54 $\pm$ 0.96 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>1</sub>	1537	460	2	1	1.24 $\pm$ 0.03 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub>
		150+100	2.96 $\pm$ 0.74 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub>	1572	422	5	1	1.22 $\pm$ 0.02 a <sub>3</sub> b <sub>3</sub> c <sub>3</sub> d <sub>1</sub>

DMSO: Dimetilsülfoksit (Çözücü kontrol), MMC: Mitomisin-C(Pozitif kontrol), PCE: Perkloretilen  
a: Çözücü kontrol ile, b:  $\alpha$ -tokoferol ile, c: Pozitif kontrol ile, d: PCE ile kıyaslamada aradaki fark önemlidir.

a<sub>1</sub>b<sub>1</sub>c<sub>1</sub>d<sub>1</sub>: P $\leq$ 0.05, a<sub>2</sub>b<sub>2</sub>c<sub>2</sub>d<sub>2</sub>: P $\leq$ 0.01, a<sub>3</sub>b<sub>3</sub>c<sub>3</sub>d<sub>3</sub>: P $\leq$ 0.001



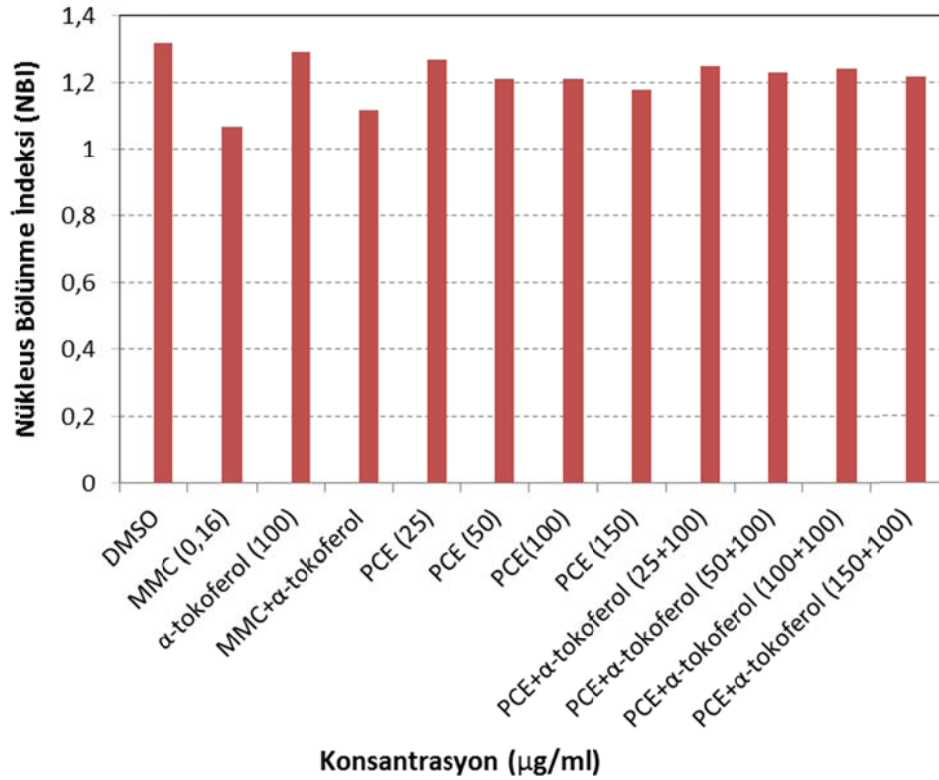
Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+α-tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde mitotik indeks.



Şekil 4.34. Farklı konsantrasyonlarda PCE ile 48 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde MI'nın konsantrasyona bağlı azalışını gösteren regresyon doğrusu ve korelasyon katsayısı. \*: P<0.05

#### 4.1.1.4. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferal Kan Lenfositlerinde Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Üzerine Etkileri

PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol uygulamasının sitokinezi engellenmiş kan lenfosit hücrelerindeki nükleus bölünmesi üzerine etkisini belirlemek amacıyla nükleus bölünme indeksi (NBI) değerleri belirlenerek Çizelge 4.3 ve Şekil 4.35'te sunulmuştur.



Şekil 4.35. Farklı konsantrasyonlarda PCE ve PCE+ $\alpha$ -tokoferol ile 48 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde NBI.

PCE ile 48 saat muamele edilen kültürlerdeki NBI değerleri, genel olarak tüm konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 150 µg/ml) hem çözücü kontrole hem de  $\alpha$ -tokoferol uygulamasına ( $\alpha$ -tokoferol ile karşılaştırmada 25 µg/ml hariç) göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştır ( $P<0.001$ ). Ancak, bu azalmalar, tüm konsantrasyonlarda pozitif kontrole kıyasla önemli derecede yüksek kalmıştır ( $P<0.001$ ). Yani, insan periferal lenfositlerine PCE uygulaması, NBI'yı pozitif kontrol olarak kullanılan MMC kadar düşürmemiştir.

PCE uygulanan kültürlerdeki NBI değerleri, konsantrasyon arttıkça azalmış, fakat istatistiksel olarak önemli bir konsantrasyon-etki ilişkisi bulunmamıştır ( $P>0.05$ ).

PCE'nin tek başına uygulandığı kültürlerle kıyasla PCE ve  $\alpha$ -tokoferolün karışım halinde uygulanması, NBI değerleri açısından, en yüksek konsantrasyon hariç diğer tüm konsantrasyonlarda önemli bir değişikliğe neden olmamıştır. En yüksek konsantrasyondaki PCE+ $\alpha$ -tokoferol (150+100  $\mu\text{g/ml}$ ; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) uygulaması 150  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyondaki PCE uygulamasına göre NBI'nın istatistiksel olarak önemli derece yükselmesine neden olmuştur ( $P<0.05$ ).

## 4.2. Tartışma

### 4.2.1. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Kromozom Anormalliği (KA) ve Mikronükleus (MN) Oluşumu Üzerindeki Etkileri

Bu çalışmada, kuru temizleme merkezlerinde yaygın bir şekilde kullanılan PCE'nin insan periferik kan lenfositlerindeki muhtemel genotoksik etkileri ile bu genotoksik etkilere karşı E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol)'nin herhangi bir koruyucu yani antigenotoksik etkisinin olup olmadığı *in vitro* KA ve sitokinez-bloklama MN testleri kullanılarak araştırılmıştır.

İnsan periferik kan lenfositlerinde KA ve MN oluşum frekanslarının değerlendirilmesi, DNA'ya hasar veren maddelerin neden olduğu biyolojik etkilerin erken tespiti için yaygın ve etkili bir şekilde kullanılan sitogenetik belirteçler arasındadır (Bonassi ve ark., 2008; Murgia ve ark., 2008). Bunun yanında, KA ve MN frekansında gözlenen herhangi bir azalma belirli bir bileşiğin antigenotoksitesinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Albertini ve ark., 2000; Kocaman ve ark., 2013).

Çalışmamızın sonuçlarına göre; 48 saat süre boyunca 25, 50, 100 ve 150  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonlarındaki PCE'nin *in vitro* olarak insan periferik kan lenfositlerine uygulanması, KA ve MN oluşumunun kontrole göre önemli derecede artmasına neden olmuştur. Bu nedenle, test edilen konsantrasyonlardaki PCE'nin insan lenfositleri üzerinde genotoksik potansiyele sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, insan lenfositlerine PCE uygulamasının, başta kromatid kırığı olmak üzere kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi, kromozom kırığı, fragment ve disentrik kromozom gibi yapısal KA'ların oluşumuna neden olarak klastojenik etki gösterdiği belirlenmiştir. PCE ile muamele edilen kültürlerde anöjenik etkinin göstergesi olan sayısal KA'lara (poliploidi ve endoreduplikasyon gibi) rastlanmamıştır. Bu durum, PCE'nin genotoksik potansiyelinin doğrudan veya dolaylı olarak DNA'da zincir kırılmalarına neden olarak ortaya çıkarabileceğini düşündürmektedir. Buna karşılık, bozulmaları ya da fonksiyonlarını yitirmeleri sonucunda sayısal KA'lara neden olan mikrotübüller ve sentriyoller üzerinde PCE'nin olumsuz bir etkisinin olmadığı fikrine de varılabilir.

Günümüze kadar PCE'nin genotoksik/kanserojenik/mutajenik potansiyelini belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmış olmakla birlikte, bu maddenin insan lenfositleri üzerindeki genotoksik etkisini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ayrıca, aşağıda kısaca tartışılan çalışmalar dikkate alındığında PCE'nin genotoksik potansiyeliyle ilgili verilerin çelişkili ve hala tartışmalı olduğu görülecektir.

Genel olarak, PCE'ye maruz bırakılan *Escherichia coli* ve *Salmonella typhimurium* hücrelerinde S9 metabolik aktivasyonu varlığında ve yokluğunda mutasyon gözlenmediği bildirilmiştir (IARC, 2014). PCE'nin, Çin hamsteri ovaryum (CHO) hücrelerinde, S9 eksojen metabolik aktivasyon sistemi varlığında ve yokluğunda kromozomal anormallikleri indüklediği bildirilmiştir (NTP, 1986). Benzer şekilde, *in vitro* olarak PCE'ye maruz bırakılan CHO hücrelerinde, PCE'nin KKD frekansını arttırmadığı ve kromozom hasarlarına neden olmadığı da bildirilmiştir (Galloway ve ark., 1987; Sofuni ve ark., 1985).

Matsushima ve ark. (1999) tarafından, PCE'nin yüksek konsantrasyonlarda (125–250 µg/ml) Çin hamsteri akciğer hücre hattında (CHL/IU) MN oluşumunu arttırmadığı, fakat daha düşük konsantrasyonda (75 µg/ml) istatistiksel olarak önemli olmasa da bir artışın olduğunu bildirmişlerdir.

Murakami ve Horikawa (1995) ise PCE'nin ddY farelerinin hepatositlerinde MN sıklığını artırdığı fakat periferik kan retikülositlerinde MN frekansında artışa neden olmadığını bildirmişlerdir. Hartmann ve Speit (1995), PCE'nin, 5 mM (~830 mg/l)'a kadar olan konsantrasyonlarda insan kan hücrelerinde DNA hasarına neden olmadığını

ve KKD frekansını arttırmadığını; sadece, en yüksek konsantrasyonda (5 mM, 24 saat uygulama) KKD'yi indüklediğini rapor etmişlerdir.

Cederberg ve ark. (2010) tarafından yapılan komet testinde, PCE'nin CD-1 farelerinin karaciğerinde konsantrasyona bağlı ve istatistiksel olarak önemli bir şekilde DNA kuyruk yoğunluğunu artırarak genotoksik olduğu fakat benzer etkinin böbrek dokusunda gözlenmediği bildirilmiştir. Bununla birlikte, aynı çalışmada alternatif bir yorum da araştırmanın yapıldığı kurumun Araştırma Direktörü tarafından aktarılmış ve PCE'nin, kullanılan deney koşulları altında farelerin karaciğer ve böbreklerinde DNA hasarı oluşturmadığı belirtilmiştir. Cederberg ve ark. (2010) tarafından yapılan bu çalışmanın sonuçları istatistiksel ve biyolojik olarak büyük tartışma yaratmıştır (Lillford ve ark., 2010; Lovell, 2010; Struwe ve ark., 2011).

Çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak, Wang ve ark. (2001) tarafından PCE'nin Çin hamsteri yumurtalık (CHO-K1) hücrelerinde MN indüksiyonunu konsantrasyona-bağlı bir şekilde arttırdığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, PCE'ye maruz bırakılan (5 mM), insan lenfoblastoid hücre hatlarında (AHH-1, h2E1 ve MCL-5) MN frekansının arttığı bildirilmiştir (Doherty ve ark. 1996). White ve ark. (2001)' da, MCL-5 hücre hattında PCE (0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mM) ile 24 saat inkübasyondan sonra MN indüksiyonunda konsantrasyona bağlı artış gözlemlenmiştir.

Ayrıca, bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak, Ünsal (2013) tarafından, 1, 3 ve 5 mM konsantrasyonlardaki PCE'nin insan periferik lenfositlerine *in vitro* olarak 48 saat uygulanması sonucunda KA, KKD ve MN oluşumunu artırarak genotoksik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ünsal (2013) tarafından yapılan çalışmada kullanılan PCE konsantrasyonları bizim test ettiğimiz konsantrasyonlara göre yüksek olmakla birlikte elde edilen sonuçların çalışmamızla uyumlu olduğunu belirtebiliriz. Bizim çalışmamızda PCE daha düşük konsantrasyonlarda (25-150 µg/ml) test edilmiş ve insan lenfositlerinde KA ve MN oluşumunu istatistiksel olarak önemli derecede artırarak genotoksik etkiye sahip bulunmuştur.

Benane ve ark. (1996) tarafından yapılan bir *in vitro* çalışmada, PCE ve metabolitlerinin, trikloroasetik asit ve dikloroasetik asidin, sıçan hepatositlerindeki hücreler arası iletişimdeki ara bağlantıları etkili bir şekilde inhibe ettiği ve hücre içi iletişimdeki bu azalmanın, tümör oluşumunda önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir.

Günümüzde, PCE, revize edilmiş Zehirli Maddeler Kontrol Yasası (USEPA, 2017) kapsamında insan sağlığına ve çevreye yönelik risklere ilişkin en önemli 10 kimyasal madde arasında yer almaktadır. Çalışmamızda elde edilen PCE'nin insan lenfositlerinde genotoksik olduğuna dair veriler bu durumu desteklemektedir.

Kawata ve ark. (2009), kültüre alınmış HepG2 insan hepatoma hücre hattında tetrakloretilen diğer adıyla PCE'nin gen ekspresyonu değişiklikleri üzerine etkisini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Araştırmacılar, PCE'nin (2 mM), gen ekspresyonunu değiştirdiği temel işlemler arasında hücre ölümü, metabolik işlemlerin düzenlenmesi, fosforilasyon, lipid biyosentezi, steroid metabolizması, hücre içi taşınma, DNA onarımı ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi biyolojik süreçlerin yer aldığını bildirmişlerdir.

Costa ve ark. (2004) PCE'nin (PCE'ye maruz kalan insan deneklerin kan seviyelerine yaklaşan konsantrasyonlarda, 1.5 µg/ml) sıçan hepatositlerine *in vitro* maruziyeti sonucunda toksisiteyi arttırdığı ve lipid peroksidasyonuna (reaktif madde olarak tiyobarbitürik asit oluşumu ölçülmüştür) neden olduğunu göstermiştir.

Lipitler, serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasarın ana hedefleridir. Lipit peroksidasyonu, zarın akışkanlığını ve geçirgenliğini değiştirerek hücre zarının zarar görmesine neden olabilir. Serbest radikallerin aracılık ettiği lipid peroksidasyonu, başlama, yayılma (ilerleme) ve sonlanmayı içeren bir dizi zincir reaksiyondur. Lipit peroksidasyonunu başlatabilen serbest radikaller arasında hidroksil radikal (en reaktif), alkoksil radikalleri, peroksil radikalleri ve peroksinitrit bulunur. Bakır ve demir iyonları gibi metal iyonları da zincir başlangıcında katalitik olarak katkıda bulunabilir (Dasgupta ve Klein, 2014).

Lipit peroksidasyonundaki ilk adım, bir pentadienil radikali haline yeniden düzenlenen bir radikal oluşturmak üzere bir çoklu doymamış (poliansatüre) yağ asidi molekülünden bis-alilik hidrojenin (bir çoklu doymamış yağ asidi içindeki iki farklı karbon-karbon çift bağına göre alilik pozisyonda olan aynı karbon atomuna bağlı hidrojen atomu) ayrılmasıdır. Poliansatüre yağ asitleri zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması, bu yağ asidi zincirinin lipid radikali (L) özelliği kazanmasına neden olur. Bu radikal daha sonra, peroksil radikalini (LO<sub>2</sub> veya LOO<sup>•</sup>) oluşturmak üzere oksijen molekülleri ile birleşir. Peroksil radikali, yeni bir pentadienil radikal ve konjüge dien lipid hidroperoksit oluşturan başka bir lipid molekülünün başka bir çoklu doymamış yağ asidi parçası ile reaksiyona girebilir ve böylece zincir



reaksiyonunu iletir (Dasgupta ve Klein, 2014). Yani, peroksil radikalleri, bir taraftan zar yapısındaki diğerkoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipit radikallerinin oluşumuna yol açarken diğerk taraftan da açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüşürler. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder ve zincir reaksiyonu ilerler (Lobo ve ark., 2010).

Tüm çoklu doymamış yağ asitleri lipit peroksidasyonuna maruz kalabilir fakat lipit peroksidasyonunun reaksiyon oranı, dokosaheksaenoik asit> eikosapentaenoik asit> araşidonik asit> linoleik asit şeklindedir. Ek olarak, siklooksijenaz ve lipoksijenaz, çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonundan da sorumlu iki enzim familyasıdır. Bu enzimler, çoklu doymamış yağ asitlerini kapsayan çeşitli reaksiyonları katalize eder, prostaglandinler ve tromboksanlar dahil olmak üzere çeşitli lipit türevlerini üretir (Xu ve ark., 2012). Bununla birlikte, lipit peroksidasyonunun başlıca son ürünleri, malondialdehit, akrolein ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi aldehitlerdir. Akrolein ve bir dereceye kadar 4-hidroksi-2-nonenal, proteinlere, DNA'ya ve fosfolipidlere zarar verebilecek yüksek oranda reaktif bileşiklerdir (Dasgupta ve Klein, 2014). Ayrıca, yüksek malondialdehit miktarının mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (Akkuş, 1995).

Bu çalışmada, insan lenfositlerinde DNA hasarı meydana getirerek genotoksik aktiviteye sahip bulunan PCE'nin lipofilik özelliğinden dolayı zar yapısındaki lipitlerle kolaylıkla etkileşime girebileceği ve lipit peroksidasyonundaki ilk adım olan, hücre zarı yapısında bulunan bir çoklu doymamış yağ asidi molekülünden hidrojenin ayrılmasına neden olarak öncü bir radikal oluşturmuş olabileceğini önerebiliriz. Bu radikal daha sonra, oksijen molekülleri ile birleşerek peroksil radikalini meydana getirmiş olabilir. Böylece, çalışmamızda PCE'nin peroksil radikallerinin oluşumunu uyararak oksidatif strese neden olduğu ve oluşan peroksil radikallerinin DNA'nın fosfodiester bağlarını kırarak kromozom hasarını uyardığı düşünülmektedir. Bu çalışmada PCE, özellikle DNA tek iplik kopmasına neden olarak en fazla kromatid kırıklarına neden olmuştur. Peroksil radikallerinin her bir DNA sarmalının omurgasını oluşturan fosfodiester bağlarının kopmasından sorumlu olduğu bildirilmiştir (Smith ve ark., 2013; Dasgupta ve Klein, 2014).

Çalışmamızın ikinci bölümünde insan lenfositlerinde PCE tarafından uyarılan genotoksik etkiler üzerine  $\alpha$ -tokoroferolün herhangi bir antigenotoksik etkisinin olup

olmadığı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, insan lenfositlerine 25, 50, 100 ve 150 µg/ml PCE ile birlikte eş zamanlı olarak 100 µg/ml α-tokoferol uygulanmıştır.

Bu çalışmada, 100 µg/ml konsantrasyondaki α-tokoferolün tek başına insan periferik lenfositlerine 48 saat uygulanması, KA ve MN oluşumunda negatif kontrole kıyasla önemli bir farklılığa neden olmamıştır. Böylece, test edilen konsantrasyondaki α-tokoferolün insan lenfositlerinde genotoksik etkiye sahip olmadığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, α-tokoferol tüm konsantrasyonlardaki PCE tarafından indüklenen KA ve MN frekansını istatistiksel olarak önemli derecede düşürerek antigenotoksik aktivite göstermiştir. Bu nedenle, α-tokoferolün PCE genotoksitesisi üzerine koruyucu etkisi olduğu sonucuna varılmıştır.

E vitamini, insan biyolojik sisteminde bulunan en etkili ve yağda eriyebilen bir antioksidan olarak kabul edilir. Serbest radikallerle etkileşime girerek lipid peroksidasyonunu önler. E vitamininin farklı moleküler formlarda olduğu bilinmektedir ve bu vitaminin biyolojik olarak en aktif formu α-tokoferoldür (Halliwell ve Gutteridge, 2015). α-Tokoferol, DNA'yı serbest radikal saldırılarına karşı ya lipid peroksil radikallerini temizleyerek ve DNA'ya zarar veren ürünler oluşturan lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırarak veya reaktif oksijen türlerini etkisiz hale getirerek koruyabilmektedir (Bisby ve ark., 1996; Sharma ve Sharma, 2012).

Bir serbest radikal temizleyici ve güçlü bir antioksidan olan E vitamini, normal hücreleri sadece bazı genotoksik ajanlar tarafından üretilen kromozomal hasarlardan korumakla kalmaz (Claycombe ve Meydani, 2001), ayrıca hasarlı DNA'nın onarımını da artırır (Konopacka ve ark., 1998; Khabour ve ark., 2013; 2015). E vitamininin valproik asit kaynaklı kromozomal hasarları azalttığı bildirilmiştir (Abdella ve ark., 2014). Ayrıca, aflatoksin B1 ve patulin gibi mikotoksinler tarafından indüklenen klastojenisiteyi azalttığı gösterilmiştir (Alpsoy ve ark., 2009a; Ayed-Boussema ve ark., 2013). Buna ek olarak, E vitamininin karbon tetraklorür (Sivikova ve ark., 2001), organofosforlu pestisitler (Lu ve ark., 2012), karbamatlı pestisitler (Sharma ve Sharma, 2012) ve civa (Purohit ve Rao, 2014) gibi çeşitli kimyasal ajanlar tarafından indüklenen genotoksitesiteye karşı koruyucu aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Ayrıca, E vitamininin normal hücreleri doksorubisin ve sisplatin gibi kemoterapide kullanılan bazı kimyasalların neden olduğu kromozomal aberasyonlardan koruduğu bildirilmiştir (Antunes ve Takahashi, 1998; Mazumdar ve ark., 2012).

Bunların dışında, E vitamininin, oksidatif stresin neden olduğu kromozomal anormalliklerin oluşumunu azalttığı ve transgenik bir fare modelinde hepatik tümör oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Factor ve ark., 2000). Son çalışmalar, E vitamininin hepatotoksisiteyi hafifletebileceğini (Hashem ve ark., 2016) ve oksaliplatin kaynaklı nöropatiyi iyileştirdiğini göstermiştir (Di Cesare Mannelli ve ark., 2012).

Alqudah ve ark (2018) tarafından yapılan çalışmada, bir antikanser ilacı olarak kullanılan oksaliplatinin insan periferel kan lenfositlerinde KA ve KKD frekansını kontrole göre önemli derecede arttırarak genotoksik olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, oksaliplatinin neden olduğu bu genotoksik hasarın, hücrelerin E vitamini (10 µg/ml) ile ön işlemden (E vitamini kültürün başlangıcında, oksaliplatin ise son 24 saat ilave edilmiştir), geçirilmesiyle önemli ölçüde azaldığı da bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları bizim yaptığımız çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olmakla birlikte; çalışmamızda 100 µg/ml tokoferol tüm kültürlerle PCE ile birlikte eş zamanlı olarak ve kültürün başlangıcından 24 saat sonra verilmiştir. Yani kültürdeki hücreler her iki madde ile aynı anda ve 48 saat muamele edilmiştir.

Ayed-Boussema ve ark. (2013), kültüre alınmış HepG2 hücrelerinde bir mikotoksin olan patulin tarafından indüklenen kromozom anormalliği yüzdesinin, E vitamini ilave edildiğinde yalnızca patulin ile muamele edilmiş hücrelere kıyasla önemli ölçüde ve konsantrasyona bağlı olarak azaldığını bildirmişlerdir.

Çalışmamıza benzer şekilde, Smalls ve Patterson (1982) tarafından 100 µg/ml konsantrasyondaki  $\alpha$ -tokoferolün *in vitro* benzo(a)piren (BP) tarafından indüklenen kromozomal hataların yüzdesini önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında Çin hamsteri akciğer (Don, CHL) ve Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerini 4 ila 28 saat boyunca tek başına BP (1 ve 5 µg/ml) ve aynı konsantrasyonlardaki BP ile birlikte 100 µg/ml  $\alpha$ -tokoferol uygulayarak muamele etmişlerdir. Araştırmacılar, BP uygulamasının CHL ve CHO hücrelerinde kromozomal anormallikleri arttırdığı ve  $\alpha$ -tokoferolün indüklenen bu hasarı 4 saatlik uygulamada bir miktar azalttığı, 28 saatlik uygulamada ise bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Literatür araştırmamıza göre, bizim çalışmamızdaki gibi PCE ve  $\alpha$ -tokoferolün birlikte uygulandığı iki çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalarda PCE'nin hepatik

oksidatif stresi indüklediği ve bu oksidatif stresin  $\alpha$ -tokoferol ile azaldığı bildirilmiştir (Ebrahim ve ark., 1996; 2001).

Ebrahim ve ark. (1996), erkek ve dişi İsviçre farelerine 15 gün boyunca ağız yoluyla (oral gavaj), susam yağı içinde çözünmüş 3.000 mg/kg günlük PCE (tetrakloroetilen) uyguladığında; farelerin karaciğer ağırlığı, dejenerasyonu ve hepatositlerin nekrozunda önemli bir artış gözlemlendiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada, ayrıca, kan glikoz seviyelerinin önemli bir şekilde azaldığı ve bu etkinin PCE ile birlikte E vitamini uygulandığı zaman hafiflediği bildirilmiştir.

Ebrahim ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada, benzer bir maruz kalma paradigması ile PCE tarafından indüklenen membran hasarına karşı E vitamininin potansiyel koruyucu özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada erkek albino İsviçre farelerine PCE bir önceki çalışmadaki şekliyle (susam yağı içinde çözünmüş PCE, oral gavajla 15 gün boyunca 3.000 mg/kg-gün); ayrıca PCE ile birlikte E vitamini (E vitamini, 15 gün boyunca günde bir kez oral gavaj ile 400 mg/kg-gün) uygulanmıştır. Araştırmacılar tarafından, PCE'nin tek başına uygulanmasında, karaciğerde, kontrol hücrelere kıyasla zara bağlı Ca-ATPaz aktivitesi artarken  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPaz ve  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPaz aktiviteleri önemli bir şekilde azalma belirlendiğini; fakat PCE ile birlikte E vitamini uygulanan hayvanlarda bu seviyelerin normale yakın kaldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, E vitamini uygulamasının ardından normal seviyelere tekrar dönmenin, E vitaminin antioksidant özelliği nedeniyle, PCE'ye maruz kalan hücrelerdeki oksidatif stresi azaltması ile olduğunu belirtmişlerdir.

Son zamanlarda yayınlanan, Ahmed ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada ise insan periferik kan mononükleer hücrelerinde, propoksür tarafından indüklenen oksidatif DNA hasarına karşı  $\alpha$ -tokoferolün (4.3  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) antioksidan rol oynayarak oksidatif DNA hasarını azalttığı gösterilmiştir.

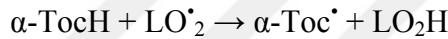
Daha önce de belirtildiği gibi, bizim çalışmamızda PCE insan periferik kan lenfositlerinde genotoksik hasarı arttırmış ve PCE ile birlikte  $\alpha$ -tokoferolün uygulanması ise PCE tarafından indüklenen bu hasarı azaltıcı yönde etki göstermiştir.

Bilindiği gibi,  $\alpha$ -tokoferol, hücreyi lipid peroksidasyonundan korumaya yardımcı olan ve bağışıklık sistemi için bir modülatör görevi gören güçlü bir zincir kıran antioksidandır (Lee ve Wan, 2002).

Zincir kıran antioksidanlar, serbest radikallerin başlattığı zincir reaksiyonu kırarak (sonlandırarak) serbest radikalleri nötralize edebilen küçük moleküllerdir. Serbest radikallerin başlattığı bir zincirleme reaksiyonun klasik örneği lipit peroksidasyonudur. Zincir kırıcı antioksidanlar ya serbest radikale bir elektron vererek ya da serbest radikalden bir elektron alarak etki eder, böylece onu stabil (kararlı) bir türe dönüştürür.

Yağda çözünen en önemli zincir kırıcı antioksidan, sekiz farklı durumda bulunan E vitaminidir ( tokoferoller ve tocotrienoller). Bununla birlikte, E vitamininin ortak şekli olan  $\alpha$ - tokoferol, lipit peroksidasyonunun zincirleme reaksiyonunu kırmada çok etkilidir (Dasgupta ve Klein, 2014).

Peki tokoferoller, lipit peroksidasyonunu nasıl inhibe ederler? Bunu, lipit peroksil radikallerini ( $LO_2^{\bullet}$ ), bu radikallerin bitişik yağ asidi yan zincirleriyle veya membran proteinleriyle reaksiyona girmesinden çok daha hızlı bir şekilde temizleyerek (yakalayarak=scavenge) yaparlar (Halliwell ve Gutteridge, 2015). Reaksiyon için hız sabitleri yaklaşık  $6 \times 10^3$  ile  $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  arasında olup; bu hız,  $LO_2^{\bullet}$ 'nin lipitlerle tepkimeye girmesinden daha hızlıdır (Niki, 2014).



Burada,  $\alpha\text{-TocH}$ :  $\alpha$ - tokoferol,  $LO_2^{\bullet}$ : lipit peroksil radikali,  $\alpha\text{-Toc}^{\bullet}$ :  $\alpha$ - tokoferoksil radikali,  $LO_2H$ : lipit hidroperoksiti göstermektedir.

Reaksiyon sonucunda oluşan  $\alpha\text{-Toc}^{\bullet}$  radikali, radikal olmayan ürünler verecek şekilde hızlı bir şekilde ( $k \sim 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) başka bir peroksil radikal ile reaksiyona girme yeteneğine sahiptir,



Dolayısıyla, bir  $\alpha$ - tokoferol molekülü, prensip olarak, iki peroksidasyon zincirini sonlandırabilmektedir, yani zincir kırıcı bir antioksidandır (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

Tokoferoksil radikali, aromatik bir alkoksil radikalidir (bazen tokoferil radikal olarak adlandırılır). Bu radikal, tekrar tokoferole dönüştürülebilir veya bir dizi reaksiyonla daha fazla oksidasyona uğrayarak örneğin tokoferilkuinonu oluşturur.  $\alpha$ - Tokoferilkuinonun hayvansal (insan dahil) dokularda bulunduğu; hidrokuinona indirgenerek metabolize edildiği (*in vitro* antioksidan özelliklere sahip) bildirilmiştir

(Neuzil ve ark., 1997). Ayrıca, Bindoli ve ark. (1985) tarafından yapılan çalışmada  $\alpha$ -tokoferolün oksidasyon ürünlerinin,  $\alpha$ -tokoferolkuinon ve  $\alpha$ -tokoferolhidrokuinon, lipit peroksidasyonunun etkili inhibitörlerinden olduğu gösterilmiştir. Bundan başka, hem  $\alpha$ -tokoferolhidrokuinon hem de ubihidrokuinon Q10'nun  $\alpha$ -tokoferoksil radikalini  $\alpha$ -tokoferole indirgediği bildirilmiştir (Denisov ve Afanas'ev, 2005).

Yüksek dozlarda  $\alpha$ -tokoferol tüketildiğinde, halka yapısı ve antioksidan aktivitesini kaybetmeden, bazıları hepatik sitokrom P450 ile  $\alpha$ -CEHC (2,5,7,8-tetrametil-2-(2-karboksietil)-6-hidroksikroman) haline indirgenebilir (Traber, 2013). Tokoferoller ayrıca singlet  $^1O_2$  ile de reaksiyona girer ve onu etkisizleştirir (Halliwell ve Gutteridge, 2015).

E vitamini (200  $\mu$ M) uygulanan *in vitro* kültüre alınmış insan periferik kan lenfositlerinin, DNA onarım sentezinin bir ölçüsü olan programlanmamış DNA sentezi hasarını (unscheduled DNA synthesis) azalttığı gösterilmiştir (Topinka ve ark., 1989).

Ayrıca, E vitamininin İnsan ağız epitel hücrelerinde  $H_2O_2$  kaynaklı hidroksil radikali oluşumunu ve DNA baz çifti modifikasyonunu (Royack ve ark., 2000) ve insan cilt hücre hattı VH10'da  $H_2O_2$  kaynaklı DNA iplik kopmalarını azalttığı bildirilmiştir (Slamenova ve ark., 1999).

Vuchetich ve ark. (1996) tarafından naftalinin lipit peroksidasyonuna neden olduğu ve E Vitamini uygulamasının, sıçan karaciğer ve beyin hücrelerinde naftalin kaynaklı lipit peroksidasyonunun yanı sıra DNA tek zincir kırıklarını inhibe ettiği bildirilmiştir.

Konopacka ve ark. (1998) radyasyon uygulamasından hemen sonra E vitamini ilavesinin, fare kemik iliği polikromatik eritrositlerinde radyasyona bağlı MN oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, bu vitaminin MN oluşumu üzerindeki inhibitör etkisinin, DNA tamir sisteminin modülasyonundan kaynaklanabileceğini ileri sürmüşlerdir. Ayrıca, araştırmacılar tarafından E vitamininin, E vitamini uygulanmamış hücrelere kıyasla hasarlı DNA'nın çıkarılma oranını arttırdığı belirlenmiştir.

Alpsoy ve ark. (2009b) yaptıkları çalışmada, E vitaminin, aflatoksin B1 tarafından indüklenen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ederek insan lenfositlerinde koruyucu etkiler gösterdiğini belirlemişlerdir. Araştırmacıların inceledikleri parametreler arasında lipit peroksidasyonun son ürünlerinden malondialdehit de bulunmaktadır.

Araştırmacılar, aflatoksin B1'in insan lenfositlerinde malondialdehit seviyesini yükselttiğini ve E vitamininin bu artışı normal seviyelere düşürdüğünü bildirmişlerdir.

Bu çalışmada,  $\alpha$ -tokoferolün, PCE tarafından oluşturulan KA ve MN sayılarında azalma sağlamış olması, antioksidan aktivitesine bağlı olarak antigenotoksik olduğunu göstermektedir.  $\alpha$ -Tokoferolün, serbest radikal zincir reaksiyonlarının ilerlemesini engelleyen (Flora, 2009) ve böylece hücre zarlarını oksidatif hasardan koruyan ve lipit peroksidasyonunu önleyen güçlü bir antioksidan (Traber ve Atkinson, 2007) olduğu göz önünde bulundurulursa, bu çalışmada, PCE'nin serbest radikal (özellikle lipit peroksil radikalleri) üretme yoluyla genotoksik aktivite gösterdiği sunucuna da varılabilir.

Böylece, çalışmamızın sonuçları, hem PCE'nin lipit peroksidasyonunu indüklediğini (Costa ve ark., 2004) hem de  $\alpha$ -tokoferolün lipit peroksidasyonunu sonlandırabilen zincir kırıcı antioksidant aktivitesini (Halliwell ve Gutterige, 2015) desteklemektedir.

Bu nedenle, elde edilen verilere dayanarak; bu çalışmada, lipofilik özelliğinden dolayı özellikle zar yapısında etkin olan PCE'nin lenfosit zarındaki poliansatüre lipitlerle etkileşime girerek özellikle peroksil radikalleri oluşturma yoluyla lipit peroksidasyonuna neden olabileceğini (böylece oksidatif strese neden olmuştur) ve bu yolla genotoksik hasara neden olduğunu; ve yine lipofilik özelliğe sahip olan  $\alpha$ -tokoferolün oluşan bu peroksil radikallerini ve dolayısıyla lipit peroksidasyonunu inhibe etme yoluyla antioksidant aktivite göstererek antigenotoksik etkiye sahip olduğunu belirtebiliriz.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre PCE'nin genotoksisite mekanizmasının oksidatif stress aracılı olduğunu önerebiliriz.

#### **4.2.2. PCE ve PCE+ $\alpha$ -Tokoferol Uygulamasının İnsan Periferik Kan Lenfositlerinde Mitotik İndeks (MI) ve Nükleus Bölünme İndeksi (NBI) Üzerine Etkileri**

Perkloretilenin insan periferik kan lenfositlerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek için MI ve NBI değerleri hesaplanmıştır. Kontrole kıyasla MI ve NBI'da meydana gelen azalmalar, hücre döngüsü sürecinin inhibisyonunun ve/veya hücrelerin çoğalma

kapasitesindeki kaybını ifade etmekte ve sitotoksik etkinin bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Çalışmamızda, PCE genel olarak yüksek üç konsantrasyonda (50, 100 ve 150 µg/ml) MI ve NBI'yi kontrole göre düşürerek insan periferal kan lenfositlerinde sitotoksik etki göstermiştir. Ünsal (2013) tarafından yapılan çalışmada da PCE (1, 3 ve 5 mM) insan lenfositlerinde PI ve MI'yi kontrole göre düşürerek sitotoksik aktivite göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları bizim yaptığımız çalışmanın sonuçlarıyla uyumludur. Fakat 1 mM PCE yaklaşık 165 µg/ml'ye denk gelmektedir. Yani bizim çalışmada PCE'nin daha düşük konsantrasyonlarda da (50, 100 ve 150 µg/ml) sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. Benzer şekilde, Ünsal ve Çelik (2018) tarafından, 1000 ppm konsantrasyondaki PCE'ye 24 saat maruz kalan *Artemia salina* larvaları üzerinde sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, Zapór ve ark. (2002), 3 ila 49 mM aralığındaki PCE ile muamele edilen izole edilmiş sıçan hepatositlerinde MTT testine göre sitotoksitenin arttığını bildirmişlerdir.

Kukongviriyapan ve ark. (1990)'nın yaptıkları *in vitro* çalışmada PCE'nin sıçan hepatositlerini doğrudan etkilediğini ve sitotoksik seviyelerde hücresel adenozin 5'-trifosfat (ATP)'nin azalmasına ve membran ATPaz aktivitesinin düşmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, sıçan hepatositlerinin buhar halinde PCE'ye (2–4 µl) maruz kalmalarının, hücre içine alınımı için ATP gerektiren taurokolat, ouabain ve 2-aminoizobütirik asidin alınımını önemli derecede azalttığını; alınımı için ATP gerektirmeyen maddeler olan kadmiyum ve 3-O-metil-D-glikozun ise hücre içine alınımını etkilemediğini göstermişlerdir.

Bizim çalışmada gözlenen sitotoksitenin sebeplerinden biri olarak, PCE'nin ATP seviyesinde bir düşüşe ve hücre zarı ATPazların inhibisyonuna neden olmasından kaynaklanabileceğini önerebiliriz. Ayrıca, bu çalışmada gözlenen MI ve NBI'daki azalmalar PCE'nin klastojenik aktivitesinden de kaynaklanabilir. Birçok araştırmada, klastojenik maddeler tarafından artan yapısal KA'ların ve DNA çift zincir kırıklarının sitotoksositeye neden olabileceği gösterilmiştir (Armstrong ve ark., 1992; Galloway ve ark., 1998; Hillard ve ark., 1998; Vock ve ark., 1998; Kirkland ve Müller, 2000). Yapısal KA'ların artması DNA replikasyon/transkripsiyon süreçlerini ve hücre proliferasyonunu inhibe ederek sitotoksik etkiye neden olabilir. Bunların dışında, hücre döngüsüne spesifik proteinlerin ve/veya enzimlerin inhibisyonu da DNA sentezi ve



hücre çoğalmasının inhibe edilmesine neden olabilir (Hung ve ark., 1996). Daha önce de belirtildiği gibi, PCE'nin birçok biyolojik işlemin gen ifadesini değiştirdiği bildirilmiştir (Kawata ve ark., 2009) ki bunlardan bazıları hücre ölümü, metabolik işlemlerin düzenlenmesi, hücre içi taşınma, DNA onarımı ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi biyolojik süreçlerle ilgilidir. PCE tarafından bu biyolojik süreçlerden birinin inhibisyonu sitotoksik etkisiyle sonuçlanabilir.

Çalışmamızda PCE tarafından uyarılan sitotoksosite üzerine  $\alpha$ - tokoferolün antisitotoksik etkisinin olup olmadığı da belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada, insan lenfositlerine PCE+ $\alpha$ -tokoferolün birlikte uygulanması (25+100, 50+100, 100+100 ve 150+100  $\mu\text{g/ml}$ ; PCE+ $\alpha$ -tokoferol) PCE'nin tek başına uygulandığı kültürlerle (25, 50, 100 ve 150  $\mu\text{g/ml}$ ) kıyasla tüm konsantrasyonlarda MI ve NBI (150+100  $\mu\text{g/ml}$ ; PCE+ $\alpha$ -tokoferol hariç) değerlerinin bir miktar artışına neden olmuş fakat bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır. Ayrıca, genel olarak, PCE+ $\alpha$ -tokoferolün birlikte uygulandığı tüm konsantrasyonlardaki MI (25+100  $\mu\text{g/ml}$ ; PCE+ $\alpha$ -tokoferol hariç) ve NBI değerleri negatif kontrole kıyasla da önemli derecede düşük kalmıştır. Bu nedenle, bu çalışmada  $\alpha$ -tokoferolün her ne kadar PCE tarafından indüklenen sitotoksositeyi azalttığı gözlenirse de önemli bir antisitotoksik aktivitesinin belirlenmediğini belirtebiliriz. Bununla birlikte, PCE tarafından indüklenen serbest radikallerin  $\alpha$ -tokoferol tarafından inhibe edilmesi, her iki maddenin birlikte uygulandığında gözlenen azalmış olan sitotoksik etkinin sebebi olabilir.

Çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde Al-quadah ve ark. (2018), insan periferik kan lenfositlerinde oksaliptatinin MI ve PI'yı düşürerek sitotoksik aktivite gösterdiği fakat  $\alpha$ -tokoferolün (10  $\mu\text{g/ml}$ ) bu sitotoksosite üzerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen sonuçların aksine, Ayed-Boussema ve ark. (2013) tarafından, MTT testine göre, bir mikotoksin olan patulin uygulanan HepG2 hücrelerine E vitamini eklenmesinin bu toksinin neden olduğu hücre ölümünü önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan hücre hattı ve test sisteminin farklı olması sonuçlarımızla uyumsuz olmasının nedeni olabilir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarına göre, kuru temizleme merkezlerinde yaygın bir şekilde kullanılan PCE'nin 25, 50, 100 ve 150 µg/ml konsantrasyonlarda insan periferik lenfositlerine *in vitro* uygulanması KA ve MN oluşumunu arttırarak genotoksik hasara neden olmuş; α-tokoferolün (100 µg/ml) ise PCE tarafından indüklenen bu genotoksik hasarı önemli bir şekilde azalttığı belirlenmiştir. Ayrıca, bu çalışmada, PCE insan lenfositlerinde sitotoksik aktivite göstermiş ve her ne kadar α-tokoferol bu sitotoksik etkiyi bir miktar azaltsa da önemli bir antisitotoksik aktivite göstermemiştir.

Hem çalışmamızın sonuçları hem de günümüze kadar yapılan diğer çalışmalar birlikte değerlendirildiğinde; bu çalışmada, PCE'nin lipit radikalleri oluşturarak lipit peroksidasyonuna neden olma yoluyla genotoksik etki gösterdiği, α-tokoferolün ise serbest radikalleri yakalayıp etkisiz hale getirerek lipit peroksidasyonunun önlenmesi yoluyla, antigenotoksik etki gösterdiğini belirtebiliriz.

PCE'nin muhtemel genotoksik etkisi göz önüne alındığında, özellikle kuru temizleme merkezlerinde çalışan insanlar PCE'ye yoğun bir şekilde maruz kaldıklarından dolayı işyerlerinde kişisel koruyucu ekipmanlarını kullanmaları önem arz etmektedir. Habib ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, kuru temizleme tesislerinde çalışanlardan kişisel koruyucu ekipmanlardan hiçbirini kullanmayanların, PCE ile ilişkili sağlık problemleri geliştirme riskinin en yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle, PCE'nin zararlı etkilerinden korunmak için işyerlerinde tüm koruyucu önlemlerin alınması önemlidir. Bu tesislerde yerel egzoz havalandırma sistemlerinin ve PCE konsantrasyonlarının denetleme cihazlarının kurulması gereklidir. Ayrıca, çalışanların PCE'nin sağlık etkileri konusunda bilinçlendirilmesi ve işlerini yaparken kişisel koruyucu ekipmanın kullanımının önemi vurgulanmalıdır.

Bunun dışında PCE'ye yoğun bir şekilde maruz kalan insanların günlük diyetlerine α-tokoferol bakımından zengin yiyecekleri (bitkisel yağlar, kuruyemişler, tahıllar ve yeşil yapraklı sebzeler) eklemesi PCE tarafından meydana gelebilecek zararlı etkileri azaltma yönünden faydalı olacaktır.

Yapılan araştırmalarda, besinlerle birlikte alınan E vitamininin herhangi bir toksik etkisi bulunmadığını; ancak, çok yüksek dozlarda alınan sentetik α-tokoferol takviyelerinin olumsuz etkileri olabileceği bildirilmiştir (NIH, 2019). Ayrıca, mevcut

araştırmalar, sentetik antioksidan takviyelerinin gerekli olmadığını göstermektedir; aksine, insan vücutunun yeterli antioksidan savunmasını elde etmek için bol miktarda meyve ve sebze içeren sağlıklı ve dengeli bir diyetin gerekli olduğu ortaya konulmuştur (Dasgupta ve Klein, 2014).

Bu nedenle, E vitamininin sentetik formları olan besin takviyesi şeklinde değil de doğal olarak tahıl, sebze ve meyvelerle birlikte günlük diyet içinde alınmasının daha faydalı olacağı düşünölmektedir. Ayrıca, biyolojik sistemlerde askorbatın (C vitamini) E vitaminini renejere etme özelliği bulunduğundan dolayı (Denisov ve Afanas'ev, 2005), özellikle PCE'ye yoğun bir şekilde maruz kalan insanların E vitamini bakımından zengin diyetlerine C vitaminini de eklemeleri  $\alpha$ -tokoferölü daha etkin kullanabilmeleri açısından uygun olacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abdella, E.M., Galaly, S.R., Mohammed, H.M., Khadrawy, S.M., 2014. Protective role of vitamin E against valproic acid-induced cytogenotoxicity and hepatotoxicity in mice. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, 67 (4): 127–139.
- Ahmed, T., Goel, V., Banerjee, B.D., 2018. Propoxur-induced oxidative DNA damage in human peripheral blood mononuclear cells: protective effects of curcumin and  $\alpha$ -tocopherol. **Drug and Chemical Toxicology**, 41 (2): 128–134.
- Akkuş, İ., 1995. **Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri**. 1. Baskı. Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım, 157 s, Konya.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., and Aitio, A., 2000. IPCS Guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, 463 (2): 111–172.
- Alpsoy, L., Agar, G., Ikbal, M., 2009a. Protective role of vitamins A, C, and E against the genotoxic damage induced by aflatoxin B1 in cultured human lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, 25 (3): 183–188.
- Alpsoy, L., Yildirim, A., Agar, G., 2009b. The antioxidant effects of vitamin A, C, and E on aflatoxin B1-induced oxidative stress in human lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, 25 (2): 121–127.
- Alqudah, M.A.Y., Al-Ashwal, F.Y., Alzoubi, K.H., Alkhatatbeh, M., Khabour, O., 2018. Vitamin E protects human lymphocytes from genotoxicity induced by oxaliplatin. **Drug and Chemical Toxicology**, 41 (3): 281–286.
- Altner, A., Atalay, H., Bilal, T., 2017. Bir antioksidan olarak E vitamini. **Balikesir Saglik Bilimleri Dergisi**, 6 (3): 149–157.
- Andreadis, A.A., Hazen, S.L., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., 2003. Oxidative and nitrosative events in asthma. **Free Radical Biology and Medicine**, 35 (3): 213–225.
- Anonim, 2018. Kuru temizleme sistemleri kanserojen tehlike saçıyor. TMMOB Kimya Mühendisleri Odası. [http://www.kmo.org.tr/genel/bizden\\_detay.php?kod=3778](http://www.kmo.org.tr/genel/bizden_detay.php?kod=3778) (Erişim Tarihi: 03/12/2018).
- Antunes, L.M.G. and Takahashi, C.S., 1998. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, 419 (1–3): 137–143.
- Armstrong, M.J., Bean, C.L., Galloway, S.M., 1992. A quantitative assessment of cytotoxicity associated with chromosomal aberration detection in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research**, 265(1): 45–60.
- Asami, S., Manabe, H., Miyake, J., Tsurudome, Y., Hirano, T., Yamaguchi, R., Itoh, H., Kasai, H., 1997. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. **Carcinogenesis**, 18 (9): 1763–1766.
- Aschengrau, A., Gallagher, L.G., Winter, M., Butler, L.J., Patricia Fabian, M., Vieira, V.M., 2018. Modeled exposure to tetrachloroethylene-contaminated drinking water and the risk of placenta-related still births: a case-control study from Massachusetts and Rhode Island. **Environmental Health**, 17 (1): 58. doi: 10.1186/s12940-018-0402-1.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 1997. Toxicological profile for tetrachloroethylene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and

- Human Services. [https://clu.in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Chemistry\\_and\\_Behavior/tox\\_profile\\_PCE.pdf](https://clu.in.org/download/contaminantfocus/dnapl/Chemistry_and_Behavior/tox_profile_PCE.pdf). (Accessed 25/02/2019).
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2014. Draft Toxicological Profile for Tetrachloroethylene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, pp. 1–318. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp18.pdf>. (Accessed 25/02/2019).
- Ayed-Boussema, I., Abassi, H., Bouaziz, C., Hlima, W.B., Ayed, Y., Bacha, H., 2013. Antioxidative and antigenotoxic effect of vitamin E against patulin cytotoxicity and genotoxicity in HepG2 cells. **Environmental Toxicology**, 28 (6): 299–306.
- Bahtnagar, A.S. and Kulshrestha, R., 2017. Chapter 2. Natural Antioxidants: Occurrence and Their Role in Food Preservation (page 41-85). In: **Natural Antioxidants**, Edited by Rituparna Banerjee, Arun K. Verma, Mohammed Wasim Siddiqui, © 2017 by Apple Academic Press, Inc.
- Banerjee, B.D., Seth, V., Ahmed, R.S., 2001. Pesticide-induced oxidative stress: perspectives and trends. **Reviews on Environmental Health**, 16 (1): 1–40.
- Beliles, R.P., Brusick, D.J., Mecler, F.J., 1980. Teratogenic-mutagenic risk of workplace contaminants: trichloroethylene, perchloroethylene, and carbon disulfide. (210-77-0047). Cincinnati, OH: **National Institute for Occupation Safety and Health**.
- Benane, S.G., Blackman, C.F., House, D.E., 1996. Effect of perchloroethylene and its metabolites on intercellular communication in clone 9 rat liver cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 48 (5): 427–437.
- Bindoli, A., Valente, M., Cavallini, L., 1985. Inhibition of lipid peroxidation by alpha-tocopherolquinone and alpha-tocopherolhydroquinone. **Biochemistry international**, 10 (5): 753-761.
- Bisby, R.H., Johnson, S.A., Parker, A.W., 1996. Quenching of reactive oxidative species by probucol and comparison with other antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, 20 (3): 411–420.
- Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., Ceppi, M., Lin, Y.P., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Fenech, M., 2003. HUMN collaborative group. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. **Mutation Research**, 543 (2): 155–166.
- Bonassi, S., Znaor, A., Norppa, H., Hagmar, L., 2004. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. **Cytogenetic and Genome Research**, 104 (1-4): 376–382.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J.D., 2005. Human population with cytogenetic biomarkers: Review of the literature and future perspectives. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 45 (2-3): 258–270.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fücic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, 28 (3): 625–631.

- Bonassi, S., Norppa, H., Ceppi, M., Strömberg, U., Vermeulen, R., Znaor, A., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Gundy, S., Hansteen, I-L., Knudsen, L.E., Lazutka, J., Rossner, P., Sram, R.J., Boffetta, P., 2008. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: Results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. **Carcinogenesis**, 29 (6): 1178–1183.
- Bramley, P.M., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K-H., 2000. Review: Vitamin E. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80: 913-938.
- Bronzetti, G., Bauer, C., Corsi, C., Del Carratore, R., Galli, A., Nieri, R., Paolini, M., 1983. Genetic and biochemical studies on perchloroethylene ‘in vitro’ and ‘in vivo’. **Mutation Research**, 116 (3–4): 323–331.
- Bull, R.J., Sanchez, I.M., Nelson, M.A., Larson, J.L., Lansing, A.J., 1990. Liver tumor induction in B6C3F1 mice by dichloroacetate and trichloroacetate. **Toxicology**, 63 (3): 341–359.
- Burton, G.W., 1994. Vitamin E: molecular and biological function. **Proceedings of the Nutrition Society**, 53 (2): 251–262.
- Callen, D.F., Wolf, C.R., Philpot, R.M., 1980. Cytochrome P-450 mediated genetic activity and cytotoxicity of seven halogenated aliphatic hydrocarbons in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, 77 (1): 55–63.
- Carocho, M. and Ferreira, I.C., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, 51: 15–25.
- Cederberg, H., Henriksson, J., Binderup, M.L., 2010. DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. **Mutagenesis**, 25 (2): 133–138.
- Claycombe, K.J. and Meydani, S.N., 2001. Vitamin E and genome stability. **Mutation Research**, 475 (1-2): 37–44.
- Comhair, S.A., Ricci, K.S., Arroliga, M., Lara, A.R., Dweik, R.A., et al. 2005a. Correlation of systemic superoxide dismutase deficiency to airflow obstruction in asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 172 (3): 306–313.
- Comhair, S.A., Xu, W., Ghosh, S., Thunnissen, F.B., Almasan, A., Calhoun, W.J., Janocha, A.J., Zheng, L., Hazen, S.L., Erzurum, S.C., 2005b. Superoxide dismutase inactivation in pathophysiology of asthmatic airway remodeling and reactivity. **The American Journal of Pathology**, 166 (3): 663–674.
- Costa, L.G., Aschner, M., Vitalone, A., Syversen, T., Soldin, O.P., 2004. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 44: 87–110.
- Da Silva Augusto, L.G., Lieber, S.R., Ruiz, M.A., de Souza, C.A., 1997. Micronucleus monitoring to assess human occupational exposure to organochlorides. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 29 (1): 46–52.
- Dasgupta, A. and Klein, K., 2014. Chapter 1: Introduction to Free Radicals and the Body’s Antioxidant Defense (Page: 1-18). In: **Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405872-9.00001-X> © 2014 Elsevier Inc. USA

- DeAngelo, A.B., Daniel, F.B., Wong, D.M., George, M.H., 2008. The induction of hepatocellular neoplasia by trichloroacetic acid administered in the drinking water of the male B6C3F1 mouse. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, 71 (16): 1056–1068.
- Denisov, E.T. and Afanas'ev, I.B., 2005. Chapter 29. Antioxidants (page 848-906). In: **Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology** © 2005. CRC Press Taylor & Francis Group 6000 Broken Sound Parkway NW, Boca Raton, FL 33487-2742.
- Dhalla, N.S., Temsah, R.M., Netticadan, T., 2000. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **Journal of Hypertension**, 18 (6): 655–673.
- Di Cesare Mannelli, L., Zanardelli, M., Failli, P., Ghelardini, C., 2012. Oxaliplatin-induced neuropathy: oxidative stress as pathological mechanism. Protective effect of silibinin. **The Journal of Pain**, 13 (3): 276–284.
- Doherty, A.T., Ellard, S., Parry, E.M., Parry, J.M., 1996. An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. **Mutagenesis**, 11 (3): 247–274.
- Dougherty, M.E., 1988. Tocopherols as food antioxidants. **Cereal Food World**, 33 (2): 222–223.
- Dut, R., Dizdar, E.A., Birben, E., Sackesen, C., Soyer, O.U., Besler, T., Kalayci, O., 2008. Oxidative stress and its determinants in the airways of children with asthma. **Allergy**, 63 (12): 1605–1609.
- Eastmond, D.A. and Tucker, J.D., 1989. Identification of Aneuploidy- Inducing Agents Using Cytokinesis-Blocked Human Lymphocytes and an Anti-Kinetochore Antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 13 (1): 34–43.
- Eastmond, D.A., Hartwig, A., Anderson, D., Anwar, W.A., Cimino, M.C., Dobrev, I., Douglas, G.R., Nohmi, T., Phillips, D.H., Vickers, C., 2009. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**, 24 (4): 341–349.
- Ebrahim, A.S., Babakrishnan, K., Sakthisekaran, D., 1996. Perchloroethylene-induced alterations in glucose metabolism and their prevention by 2-deoxy-D-glucose and vitamin E in mice. **Journal of Applied Toxicology**, 16 (4): 339–348.
- Ebrahim, A.S., Babu, E., Thirunavukkarasu, C., Sakthisekaran, D., 2001. Protective role of vitamin E, 2-deoxy-D-glucose, and taurine on perchloroethylene induced alterations in ATPases. **Drug and Chemical Toxicology**, 24 (4): 429–437.
- Ercan, H., Birben, E., Dizdar, E.A., Keskin, O., Karaaslan, C., Soyer, O.U., Dut, R., Sackesen, C., Besler, T., Kalayci, O., 2006. Oxidative stress and genetic and epidemiologic determinants of oxidant injury in childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 118 (5): 1097–1104.
- Evans, H.J., 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., **Handbook of Mutagenicity Test Procedures**. Elsevier Science, 405–427, Amsterdam.
- Factor, V.M., Laskowska, D., Jensen, M.R., Voitach, J.T., Popescu, N.C., Thorgeirsson, S.S., 2000. Vitamin E reduces chromosomal damage and inhibits hepatic tumor formation in a transgenic mouse model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 97 (5): 2196–2201.



- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, 392 (1-2): 11–18.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, 455 (1-2): 81–95.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, 2 (5): 1084–1104.
- Fenech, M., 2010. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. **Health Physics**, 98 (2): 234–243.
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., and Zeiger, E., 2003. HUMAN MICRONUCLEUS project. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, 534 (1–2): 65–75.
- Fenech, M., Holland, N., Zeiger, E., Chang, W.P., Burgaz, S., Thomas, P., Bolognesi, C., Knasmueller, S., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., 2011a. The HUMN and HUMNxL international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells--past, present and future. **Mutagenesis**, 26 (1): 239–245.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surralles, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D. and Thomas, P., 2011b. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, 26 (1): 125–132.
- Fenech, M., Knasmueller, S., Bolognesi, C., Bonassi, S., Holland, N., Migliore, L., Palitti, F., Natarajan, A.T., Kirsch-Volders, M., 2016. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. **Mutation Research**, 770 (Pt A): 12-25.
- Fitzpatrick, A.M., Teague, W.G., Holguin, F., Yeh, M., Brown, L.A., 2009. Severe Asthma Research Program. Airway glutathione homeostasis is altered in children with severe asthma: evidence for oxidant stress. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 123 (1): 146–152.
- Flora, S.J., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2 (4): 191–206.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B., Zeiger, E., 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 10: 1–175.
- Galloway, S.M., Miller, J.E., Armstrong, M.J., Bean, C.L., Skopek, T.R., and Nichols, W.W., 1998. DNA synthesis inhibition as an indirect mechanism of chromosome aberrations: Comparison of DNA reactive and non-DNA-reactive clastogens. **Mutation Research**, 400: 169–186.
- Giray, B., Gurbay, A., Hincal, F., 2001. Cypermethrin-induced Oxidative Stress in Rat Brain and Liver is Prevented by Vitamin E or Allopurinol. **Toxicology Letters**, 118 (3): 139–146.
- Gedik, C.M., Boyle, S.P., Wood, S.G., Vaughan, N.J., Collins, A.R., 2002. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. **Carcinogenesis**, 23 (9): 1441–1446.



- Green, T., Odum, J., Nash, J.A., Foster, J.R., 1990. Perchloroethylene-induced rat kidney tumors: an investigation of the mechanisms involved and their relevance to humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 103 (1): 77–89.
- Gülçin, İ., 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, 86 (3): 345–391.
- Habib, S., Ahmed, H.O., Al-Muhairi, N., Ziad, R., 2018. Preliminary Study: Environmental Assessment of Perchloroethylene in Dry-Cleaning Facilities in the UAE. **Journal of Environmental and Public Health**, 2018:1-5. DOI: 10.1155/2018/1732906.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., 2015. Chapter 4. Antioxidants from the diet (page 153-197). In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. Fifth Edition. © Barry Halliwell and John M.C. Gutteridge 2015. Published in 2015 by Oxford University Press.
- Hartmann, A. and Speit, G., 1995. Genotoxic effects of chemicals in the single cell gel (SCG) test with human blood cells in relation to the induction of sister-chromatid exchanges (SCE). **Mutation Research**, 346 (1): 49–56.
- Hashem, R.M., Hassanin, K.M., Rashed, L.A., Mahmoud, M.O., Hassan, M.G., 2016. Effect of silibinin and vitamin E on the ASK1-p38 MAPK pathway in D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatotoxicity. **Experimental Biology and Medicine**, 241 (11): 1250–1257.
- Hillard, C.A., Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., Galloway, S.M., 1998. Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of non-mutagenic chemicals and metabolic poisons. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 31 (4): 316–326.
- Hung, D.T., Jamison, T.F., Schreiber, S.L., 1996. Understanding and controlling the cell cycle with natural products. **Chemistry & Biology**, 3 (8): 623–639.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1995. Tetrachloroethylene. In *Dry Cleaning, Some Chlorinated Solvents and Other Industrial Chemicals*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 63., pp. 159–221. Lyon, France. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol63/mono63.pdf>. (Accessed 04.12.2018).
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2014. Trichloroethylene, tetrachloroethylene, and some other chlorinated agents. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 106, pp 219–351. ISBN-13 (PDF): 978-92-832-0172-8. Lyon, France. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono106.pdf>. (Accessed 04.12.2018).
- Ikeda, M., Koizumi, A., Watanabe, T., Endo, A., Sato, K., 1980. Cytogenetic and cytokinetic investigations on lymphocytes from workers occupationally exposed to tetrachloroethylene. **Toxicology Letters**, 5 (3–4): 251–256.
- Institute of Medicine., 2000. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9810>.
- Jenner, P., 2003. Oxidative stress in Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, 53: S26–S36.
- Jiang, Q., 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammation activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, 72: 76–90.

- Kasparova, S., Brezova, V., Valko, M., Horecký, J., Mlynárik, V., Liptaj T, Vancová O, Ulicná O, Dobrota D. 2005. Study of the oxidative stress in a rat model of chronic brain hypoperfusion. **Neurochemistry International**, 46 (8): 601–611.
- Kawata, K., Shimazaki, R., Okabe, S., 2009. Comparison of gene expression profiles in HepG2 cells exposed to arsenic, cadmium, nickel, and three model carcinogens for investigating the mechanisms of metal carcinogenesis. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 50 (1): 46–59.
- Kerr, S., Brosnan, M.J., McIntyre, M., Reid, J.L., Dominiczak, A.F., Hamilton, C.A., 1999. Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. **Hypertension**, 33 (6): 1353–1358.
- Khabour, O.F., Alawneh, K., Al-Kofahi, E., Mesmar, F., 2015. Assessment of genotoxicity associated with Behcet's disease using sister-chromatid exchange assay: vitamin E versus mitomycin C. **Cytotechnology**, 67 (6): 1051–1057.
- Khabour, O.F., Soudah, O.A., Aaysh, M.H., 2013. Genotoxicity assessment in iron deficiency anemia patients using sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations assays. **Mutation Research**, 750 (1–2): 72–76.
- Konopacka, M., Rzeszowska-Wolny, J., 2001. Antioxidant vitamins C, E and beta-carotene reduce DNA damage before as well as after gamma-ray irradiation of human lymphocytes in vitro. **Mutation Research**, 491 (1-2): 1–7.
- Konopacka, M., Widel, M., Rzeszowska-Wolny, J., 1998. Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. **Mutation Research**, 417 (2–3): 85–94.
- Kirkland, D.J. and Müller, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: The importance of thresholds. **Mutation Research**, 464 (1): 137–147.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P., 1997. The in vitro micronucleus test: A multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. **Mutation Research**, 392 (1-2): 19–30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, Jr.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrallés, J., Vanhauwaert, A., Wakata, A. 2003. Report from the in vitro micronucleus assay working group. **Mutation Research**, 540 (2): 153–163.
- Kocaman, A.Y. and Topaktaş, M., 2007. In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 48 (6): 483–490.
- Kocaman, A.Y., Istifli, E.S., Büyükleyla, M., Rencüzoğulları, E., Topaktaş, M., 2013. In vitro evaluation of the protective effects of 4-thujanol against mitomycin-C and cyclophosphamide induced genotoxic damage in human lymphocytes. **Toxicology and Industrial Health**, 29 (1): 23–37.
- Koch, R., Schlegelmilch, R., Wolf, H.U., 1988. Genetic effects of chlorinated ethylenes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutation Research**, 206 (2): 209–216.
- Kukongviriyapan, V., Kukongviriyapan, U., Stacey, N.H., 1990. Interference with hepatocellular substrate uptake by 1,1,1-trichloroethane and tetrachloroethylene. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 102 (1): 80–90.

- Kukreja, R.C., Hess, M.L., 1992. The oxygen free-radical system: from equations through membrane–protein interactions to cardiovascular injury and protection. *Cardiovascular Research*, 26 (7): 641–655.
- Lanhance, P.A., Nakat Zeina, B.S., Woo-Sik Jeong, M.S., 2001. Antioxidants: An integrative approach. *Nutrition*, 17 (10): 835–838.
- Lee, C.J. and Wan, J.M., 2002. Immunoregulatory and antioxidant performance of  $\alpha$ -tocopherol and selenium on human lymphocytes. *Biological Trace Element Research*, 86 (2): 123–136.
- Lee, P. and Ulatowski, L.M., 2019. Vitamin E: Mechanism of transport and regulation in the CNS. *IUBMB Life*, 71 (4): 424–429.
- Lillford, L., Beevers, C., Bowen, D., Kirkland, D., 2010. RE: DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. (Mutagenesis, 25, 133–138, 2010). *Mutagenesis*, 25 (4): 427–428. author reply 429–430.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., DiBerardino, D., Ursini, M.V., 1998. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutation Research*, 403 (1–2): 13–20.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4 (8): 118–126.
- Lovell, D., 2010. Is tetrachloroethylene genotoxic or not. *Mutagenesis*, 25 (5): 443–446.
- Lu, X.T., Ma, Y., Wang, C., Zhang, X.F., Jin, D.Q., Huang, C.J., 2012. Cytotoxicity and DNA damage of five organophosphorus pesticides mediated by oxidative stress in PC12 cells and protection by vitamin E. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 47 (5): 445–454.
- Lyras, L., Cairns, N.J., Jenner, A., Jenner, P., Halliwell, B., 1997. An assessment of oxidative damage to proteins, lipids, and DNA in brain from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 68 (5): 2061–2069
- Ma, J., Lessner, L., Schreiber, J., Carpenter, D.O., 2009. Association between residential proximity to PERC dry cleaning establishments and kidney cancer in New York City. *Journal of Environmental and Public Health*, 2009: 183920. doi:10.1155/2009/183920.
- Mandel, J.S., McLaughlin, J.K., Schlehofer, B., Mellempgaard, A., Helmert, U., Lindblad, P., McCredie, M., Adami, H.O., 1995. International renal-cell cancer study. IV. Occupation. *International Journal of Cancer*, 61 (5): 601–605.
- Manoharan, K. and Banerjee, M.R., 1985. Beta-carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cell in organ culture. *Cell Biology International Reports*, 9 (9): 783–789.
- Mazumdar, M., Giri, S., Roy, S., 2012. Role of vitamin E-acetate on cisplatin induced genotoxicity: an in vivo analysis. *Open Life Sciences*, 7 (2): 334–342.
- Matsushima, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Ishidate, M., Miura, K.F., Shimizu, H., Suzuki, Y., Morimoto, K., Ogura, H., Mure, K., Koshi, K., Sofuni, T., 1999. Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis*, 14 (6): 569–580.
- Mazzullo, M., Grilli, S., Lattanzi, G., Prodi, G., Turina, M.P., Colacci, A., 1987. Evidence of DNA binding activity of perchloroethylene. *Research*

- Communications in Chemical Pathology and Pharmacology**, 58 (2): 215–235.
- McDermott, C. and Heffron, J.J., 2013. Toxicity of industrially relevant chlorinated organic solvents in vitro. **International Journal of Toxicology**, 32 (2): 136–145.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C., 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal functions. **Journal of Dairy Science**, 76 (9): 2812–2823.
- Mosesso, P., Cinelli, S., Natarajan, A.T., Palitti, F., 2013. In vitro cytogenetic assays: Chromosomal aberrations and micronucleus tests. (A. Dhawan and M. Bajpayee eds.). In: **Genotoxicity assessment: Methods and protocols, methods in molecular biology**, © Springer Science+Business Media. 1044: 123-146. DOI 10.1007/978-1-62703-529-3\_6, New York.
- Muller, D.P.R., and Goss-Sampson, M.A., 1990. Neurochemical, neurophysiological and neuropathological studies in vitamin E deficiency. **Critical Reviews in Neurobiology**, 5(3): 239-263.
- Muniz, J.F., McCauley, L., Scherer, J., Lasarev, M., Koshy, M., Kow, Y.W., Nazar-Stewart, V., Kisby, G.E., 2008. Biomarkers of oxidative stress and DNA damage in agricultural workers: a pilot study. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 227 (1): 97–107.
- Murakami, K. And Horikawa, K., 1995. The induction of micronuclei in mice hepatocytes and reticulocytes by tetrachloroethylene. **Chemosphere**, 31 (7): 3733–3739.
- Murgia, E., Ballardini, M., Bonassi, S., Rossi, A.M., Barale, R., 2008. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case– control study. **Mutation Research**, 639 (1–2): 27–34.
- Neuzil, J., Witting, P.K., Stocker, R., 1997. Alpha-tocopheryl hydroquinone is an efficient multifunctional inhibitor of radical-initiated oxidation of low density lipoprotein lipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94 (15): 7885–7890.
- NIH (National Institutes of Health), 2019. Vitamin E, Fact Sheet for Health Professionals. U.S. Department of Health & Human Services. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-HealthProfessional/#h3> (Accessed 20.01.2019).
- Niki, E., 2014. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. **Free Radical Biology and Medicine**, 66: 3–12.
- Norppa, H. and Falck, G.C-M., 2003. What do human micronuclei contain? **Mutagenesis**, 18 (3): 221–233.
- NRC (National Research Council), 2010. Review of the Environmental Protection Agency's Draft IRIS Assessment of Tetrachloroethylene. Committee to Review EPA's Toxicological Assessment of Tetrachloroethylene; National Research Council, ISBN 978-0-309-15094-1, Washington. Available from The National Academies Press at [http://www.nap.edu/catalog.php?record\\_id=12863](http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=12863)
- NTP (National Toxicology Program), 1986. Toxicology and carcinogenesis studies of tetrachloroethylene (perchloroethylene) (CAS no. 127-18-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). (NTP TR 311). Research Triangle Park,

- NC: U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program. [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT\\_rpts/tr311.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr311.pdf).
- NTP (National Toxicology Program), 2016. Report on Carcinogens, Fourteenth Edition.: Tetrachloroethylene, Roc Profile: Tetrachlorethylene; 14th RoC 2016. Reserach Triangle Park, NC: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/tetrachloroethylene.pdf>
- Özcan, O., Hüseyin Erdal, H., Çakırca, G., Yönden, Z., 2015. Oxidative stress and its impacts on intracellular lipids, proteins and DNA. **Journal of Clinical and Experimental Investigations**, 6 (3): 331–336.
- Paz-y-Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E., Leone, P.E., 2002. Cytogenetic monitoring in a population occupationally exposed to pesticides in Ecuador. **Environmental Health Perspectives**, 110 (11): 1077–1080.
- Potter, C.L., Chang, L.W., De Angelo, A.B., Daniel, F.B., 1996. Effects of four trihalomethanes on DNA strand breaks, renal hyaline droplet formation and serum testosterone in male F-344 rats. **Cancer Letters**, 106 (2): 235–242.
- Preston, R.J., San Sebastian, J.R. and McFee, A.F., 1987. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. **Mutation Research**, 189 (2): 175–183.
- Purdue, M.P., Stewart, P.A., Friesen, M.C., Colt, J.S., Locke, S.J., Hein, M.J., Waters, M.A., Graubard B.I., Davis, F., Ruterbusch, J., Schwartz, K., Chow, W.H., Rothman, N., Hofmann, J.N., 2017. Occupational exposure to chlorinated solvents and kidney cancer: a case-control study. **Occupational and Environmental Medicine**, 74 (4): 268–274.
- Purohit, A.R. and Rao, M.V., 2014. Mitigative role of melatonin and a-tocopherol against mercury-induced genotoxicity. **Drug and Chemical Toxicology**, 37 (2): 221–226.
- Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., 1991. The relationship between quantities of bromodeoxyuridine and human peripheral blood with determination of the best differential staining of sister chromatids using chromosome medium-B. **Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 5 (3): 19–24.
- Rocco, L., Mottola, F., Santonastaso, M., Saputo, V., Cusano, E., Costagliola, D., Suero, T., Pacifico, S., Stingo, V., 2015. Anti-genotoxic ability of  $\alpha$ -tocopherol and anthocyanin to counteract fish DNA damage induced by musk xylene. **Ecotoxicology**, 24 (9): 2026–2035.
- Rothfuss, A., Schütz, P., Bochum, S., Volm, T., Eberhard, t E., Kreirenberg, R., Vogel, W. and Speit, G., 2000. Induced micronucleus frequencies in peripheral lymphocytes as a screening test for carriers of a BRCA1 mutation in breast cancer families. **Cancer Research**, 60 (2): 390–394.
- Royack, G.A., Nguyen, M.P., Tong, D.C., Poot, M., Oda, D., 2000. Response of human oral epithelial cells to oxidative damage and the effect of Vitamin E. **Oral Oncology**, 36 (1): 37–41.
- Sayre, L.M., Smith, M.A., Perry, G., 2001. Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. **Current Medicinal Chemistry**, 8 (7): 721–738.
- Seiji, K., Jin, C., Watanabe, T., Nakatsuka, H., Ikeda, M., 1990. Sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of workers exposed to benzene, trichloroethylene, or tetrachloroethylene, with reference to smoking habits.



- International Archives of Occupational and Environmental Health**, 62 (2): 171–176.
- Sharma, R.K. and Sharma, B., 2012. In-vitro carbofuran induced genotoxicity in human lymphocytes and its mitigation by vitamins C and E. **Disease Markers**, 32 (3): 153–163.
- Singh, U., Devaraj, S., Jialal, I., 2005. Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annual Review of Nutrition**, 25: 151-174.
- Siviková, K., Piesová, E., Dianovský, J., 2001. The protection of Vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-induced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. **Mutation Research**, 494 (1–2): 135–142.
- Slamenová, D., Horváthová, E., Kosíková, B., Ruzeková, L., Lábaj, J., 1999. Detection of lignin biopolymer- and vitamin E-stimulated reduction of DNA strand breaks in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- and MNNG-treated mammalian cells by the comet assay. **Nutrition and Cancer**, 33 (1): 88–94.
- Smalls, E. and Patterson, R.M., 1982. Reduction of benzo(a)pyrene induced chromosomal aberrations by DL-alpha-tocopherol. **European Journal of Cell Biology**, 28 (1): 92–97.
- Smith, J.A., Park, S., Krause, J.S., Banik, N.L., 2013. Oxidative stress, DNA damage and the telomeric complex as therapeutic targets in acute neurodegeneration. **Neurochemistry International**, 62 (5):764–775.
- Sofuni, T., Hayashi, M., Matsuoka, A., Sawada, M., Hatanaka, M., Ishidate, M. Jr., 1985. Mutagenicity tests on organic chemical contaminants in city water and related compounds. II. Chromosome aberration tests in cultured mammalian cells. [Article in Japanese] **Eisei Shikenjo hokoku: Bulletin of National Institute of Hygienic Sciences**, 103: 64–75.
- Stewart, R.D., Dodd, H.C., 1964. Absorption of carbon tetrachloride, trichloroethylene, tetrachloroethylene, methylene chloride, and 1,1,1-trichloroethane through the human skin. **American Industrial Hygiene Association Journal**, 25 (5): 439–446.
- Struwe, M., Zeller, A., Singer, T., Gocke, E., 2011. Possibility of methodical bias in analysis of comet assay studies: Re: DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. (Mutagenesis, 25, 133-138, 2010). **Mutagenesis**, 26 (3): 473–474.
- Sundram, K., Sambanthamurthi, R., Tan, Y.A., 2003. Palm fruit chemistry and nutrition. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, 12 (3): 355–362.
- Sweeney, L.M., Kirman, C.R., Gargas, M.L., Dugard, P.H., 2009. Contribution of trichloroacetic acid to liver tumors observed in perchloroethylene (perc)-exposed mice. **Toxicology**, 260 (1–3): 77–83.
- Titenko-Holland, N., Windham, G., Kolachana, P., Reinisch, F., Parvatham, S., Osorio, A.M. and Smith, M.T., 1997. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and in vivo: A study of malathion-exposed workers. **Mutation Research**, 388 (1): 85–95.
- Topinka, J., Binkova, B., Sram, R.J., Erin, AN., 1989. The influence of alpha-tocopherol and pyritinol on oxidative DNA damage and lipid peroxidation in human lymphocytes, **Mutation Research**, 225 (3): 131–136.
- Toraason, M., Clark, J., Dankovic, D., Mathias, P., Skaggs, S., Walker, C., Werren, D., 1999. Oxidative stress and DNA damage in Fischer rats following acute

- exposure to trichloroethylene or perchloroethylene. **Toxicology**, 138 (1): 43–53.
- Toshniwal, PK. and Zarling, EJ., 1992. Evidence for increased lipid peroxidation in multiple sclerosis. **Neurochemical Research**, 17 (2): 205–207.
- Traber, M.G. and Arai, H., 1999. Molecular mechanism of vitamin E transport. **Annual Review of Nutrition**, 19: 343–355.
- Traber, M.G. and Atkinson, J., 2007. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology and Medicine**, 43 (1): 4–15.
- Traber, M.G., 2013. Mechanisms for the prevention of vitamin E excess. **Journal of Lipid Research**, 54 (9): 2295–2306.
- Tucker, J.D., Sorensen, K.J., Ruder, A.M., McKernan, L.T., Forrester, C.L., Butler, M.A., 2011. Cytogenetic analysis of an exposed-referent study: perchloroethylene –exposed dry cleaners compared to unexposed laundry workers. **Environmental Health**, 10:16. doi: 10.1186/1476-069X-10-16.
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2012. Toxicological review of Tetrachloroethylene (Perchloroethylene) (CAS No. 127-18-4). In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). (EPA/635/R-08/011F). Washington, DC. [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris\\_documents/documents/toxr\\_eviews/0106tr.pdf](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxr_eviews/0106tr.pdf). (Accessed 25/02/2019).
- USEPA (U.S. Environmental Protection Agency), 2017. EPA Names First Chemicals for Review Under New TSCA Legislation. Washington, DC. [https://19january2017snapshot.epa.gov/newsreleases/epa-names-first-chemicals-review-under-new-tsca-legislation\\_.html](https://19january2017snapshot.epa.gov/newsreleases/epa-names-first-chemicals-review-under-new-tsca-legislation_.html). (Accessed 04/12/2018).
- Ünsal, Ü., 2013. Perkloretilen (PERC)'in sitotoksik ve in-vitro genotoksik etkisinin farklı test sistemleri ile araştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi (2013-YL-061), Aydın/Türkiye.
- Ünsal, Ü., Çelik, TA. 2018. Perkloretilen'in in vitro sitotoksik etkisinin Brine Shrimp letalite testi ile araştırılması. **KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi**, 21 (5): 644–649.
- Xu, Y., Gu, Y., Qian, S.Y., 2012. An advanced electron spin resonance (ESR) spin trapping and LC(ESR) MS technique for the study of lipid peroxidation. **International Journal of Molecular Sciences**, 13 (11): 14648–14666.
- Valencia, R., Mason, J.M., Woodruff, R.C., Zimmering, S., 1985. Chemical mutagenesis testing in Drosophila. III. Results of 48 coded compounds tested for the National Toxicology Program. **Environmental Mutagenesis**, 7 (3): 325–348.
- Vock, E.H., Lutz, W.K., Hormes, P., Hoffmann, H.D., Vamvakas, S., 1998. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100 and gamma-irradiation. **Mutation Research**, 413 (1): 83–94.
- Vuchetich, P.J., Bagchi, D., Bagchi, M., Hassoun, E.A., Tang, L., Stohs, S.J., 1996. Naphthalene-induced oxidative stress in rats and the protective effects of Vitamin E succinate, **Free Radical Biology and Medicine**, 21 (5): 577–590.
- Walles, S.A.S., 1986. Induction of single-strand breaks in DNA of mice by trichloroethylene and tetrachloroethylene. **Toxicology Letters**, 31 (1): 31–35.

- Wang, J.L., Chen, W.L., Tsai, S.Y., Sung, P.Y., Huang, R.N., 2001. An in vitro model for evaluation of vaporous toxicity of trichloroethylene and tetrachloroethylene to CHO-K1 cells. **Chemico-Biological Interactions**, 137 (2): 139–154.
- Waters, M.D., Brady, A.L., Stack, H.F., Brockman, H.E., 1990. Antimutagenic profiles for some model compounds. **Mutation Research**, 238 (1): 57–85.
- White, I.N., Razvi, N., Gibbs, A.H., Davies, A.M., Manno, M., Zaccaro, C., De Matteis, F., Pähler, A., Dekant, W., 2001. Neoantigen formation and clastogenic action of HCFC-123 and perchloroethylene in human MCL-5 cells. **Toxicology Letters**, 124 (1–3): 129–138.
- Willy, C., Thiery, J., Menger, M., Messmer, K., Arfors, K.E., Lehr, H.A., 1995. Impact of vitamin E supplement in standard laboratory animal diet on microvascular manifestation of ischemia/reperfusion injury. **Free Radical Biology and Medicine**, 19 (6): 919–926.
- Zapór, L., Skowron, J., Golofit-Szymczak, M., 2002. The cytotoxicity of some organic solvents on isolated hepatocytes in monolayer culture. **International Journal of Occupational Safety and Ergonomics**, 8(1): 121–129.
- Zhang, P., Omaye, S.T., 2001.  $\beta$ -carotene: interactions with  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid in microsomal lipid peroxidation. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, 12 (1): 38–45.



## ÖZGEÇMİŞ

Kübra ASFUROĞLU 17.12.1989 tarihinde HATAY’da doğdu. Antakya Necmi Asfuroğlu Anadolu Lisesi’ni bitirdikten sonra Haliç Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 2012 yılında mezun oldu. 2016 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Biyoloji Bölümünde yüksek lisans programına başladı.

