

**KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE SODYUM
HİPOKLORİT'İN *İN VİTRO* MUTAJENİK ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Asu SAVSAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç.Dr. Süleyman GÜL

HAZİRAN-2009

KARS

T.C. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans öğrencisi Asu SAVSAR' ın yüksek lisans tezi olarak hazırladığı
“**İNSAN LENFOSİT KÜLTÜRÜ YÖNTEMİ İLE SODYUM HİPOKLORİT'İN
İN VİTRO MUTAJENİK ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı bu çalışma, yapılan
tez savunması sınavı sonunda jüri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca
değerlendirilerek oy.....ile kabul edilmiştir.

...../...../2009

	Adı Soyadı	İmza
Başkan	: Doç. Dr. Süleyman GÜL
Üye	: Yard. Doç. Dr. Hasan ORAL
Üye	: Yard. Doç. Dr.Hüseyin GEY

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/..../2009 gün
ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Abdullah DOĞAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Bu çalışmanın tez konusu olarak seçiminde ve yürütülmesinde, bana gerekli laboratuvar olanakları sunan, yol gösteren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen sayın hocam, Doç.Dr. Süleyman GÜL'e, tezimin yazımında ve yorumlanmasında emeği geçen doktora öğrencisi Pınar AKSU'ya ve yüksek lisans öğrencisi Zeynep TAYFA'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında yanımda olarak, bana her konuda destek olan sevgili eşim Metin SAVSAR'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
RESİMLERİN LİSTESİ	vi
TABLolarIN LİSTESİ	vii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Dezenfektanlar	6
2.1.1. Dezenfeksiyonu etkileyen faktörler	7
2.1.2.Yüksek seviyeli dezenfektanlar	7
2.1.3.Orta seviyeli dezenfektanlar	7
2.1.4. Düşük seviyeli dezenfektanlar	7
2.2. Çamaşır Suyu	7
2.3. Klor Salan Bileşikler	8
2.4. Sodyum Hipoklorit	12
2.5. ÇAMAŞIR SUYUNUN TARİHÇESİ	14
2.6. SODYUM HİPOKLORİT VE GENOTOKSİTESİ	16
2.7. ANALİZ YÖNTEMLERİ	18
2.7.1. Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi	18
2.7.1.1. İn-vivo kromozom hatası testi	18
2.7.1.2. İn-vitro kromozom hatası testi	19
3. MATERYAL ve METOT	20
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
3.1.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl) (Sigma)	20
3.1.2. Mitomisin C (MMC)	20
3.1.2.1. Mitomisin C (MMC)'nin Özellikleri	20

3.1.2.2. Mitomisin C (MMC)'nin Kullanım Alanları	21
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Eriyiklerinin Hazırlanması	21
3.1.3.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Eriyiğinin Hazırlanması	22
3.1.3.2. Mitomisin C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması	22
3.1.3.3. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması	23
3.1.4. Kromozom Medyumu	23
3.1.5. Kolşisin	23
3.1.6. Hipotonik Eriyik	24
3.1.7. Fiksatif	24
3.1.8. Giemsa	24
3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları	24
3.3. Sarf Malzemeler	25
3.4. Kromozom Anormallikleri (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması	26-28
3.5. Mikroskopik İnceleme	28
3.5.1. Kromozom Anomalilerininin Saptanması	28
3.6. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi	28
4. BULGULAR	29-37
5. TARTIŞMA	38-42
6. KAYNAKLAR	42-45
7. ÖZ GEÇMİŞ	46

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, içme ve kullanma sularının dezenfeksiyonu için kullanılan NaOCl'nin genotoksik etkilerinin incelenmesiydi. İnsan kan lenfosit hücreleri NaOCl'nin 0.015, 0.030, 0.065, 0.100, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg /ml'lik dozları ile 24 saat etkileşime bırakıldı. Pozitif kontrol olarak kullanılan mitomycin C (MMC, 0.3 µg/ml) ve negatif kontolle karşılaştırıldığında NaOCl'nin tüm uygulama derişimlerinde, 24 saatte, kromozomal aberasyonların sıklığını belirgin bir şekilde artırdığı gözlenmiştir. 0.015 µg /ml derişimi dışında, tüm uygulama derişimlerinde kromozom ve kromatid kırıkları, kardeş kromatid birleşmeleri ve kromatid değişimleri saptandı. Bazı NaOCl konsantrasyonları ve pozitif kontrol, poliploidi gözlenmesine sebep oldu. Sonuçlarımız, NaOCl'nin insan lenfosit kromozomları üzerine *in-vitro* olarak klastojenik ve anöjenik etkisinin olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: NaOCl, Mitomisin C (MMC), lenfosit kültürü, İnsan kromozomları, Kromozom aberasyonları.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the genotoxic effects of NaOCl which is used for disinfection of drinking and utility water. Human peripheral blood lymphocyte cells were treated with 0.015, 0.030, 0.065, 0.100, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 µg /ml concentrations of NaOCl for 24 h. A significant increase was observed for induction of chromosomal aberration frequency in all treatments of NaOCl concentrations for 24 h comparing with the negative control and mitomycin C (MMC, 0.3 µg/ml) which was used as positive control. Chromatid and chromosome breaks, sister chromatid union and chromatid exchange were observed in all treatment concentrations except for 0.015 µg /ml. Some NaOCl concentrations and positive control produced polyploidy. Our results suggest that NaOCl has clastogenic and aneugenic potential for human lymphocytes chromosomes *in-vitro*.

Key words: NaOCl, Mitomycin C (MMC), Lymphocyte cultures, Human chromosomes, Chromosome aberrations.

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

- MN : Mikronükleus
SCE : Kardeş kromatid değişimi
KKD : Kardeş kromozomlarda kromatid değişimi
AA-AH :Anafaz hataları
Ns :Önemsiz
LC :Letal doz
BN : Binükleer
PHA : Fitohemaglutinin
SHE : Suriye Hamster Embriyo

RESİMLERİN LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Resim 1. a, b, c. Normal bir bayana ait kromozomlar.	30
Resim 2. Mitomisin-c'nin insan kromozomlarına etkisi.	31
Resim 3. 5 µg /ml'lik NaOCl dozunda mitozun baskılandığı ancak kromozomların bantlandığı ve çok sayıda kırığın olduğu gözlenmiştir.	32
Resim 4. 4 µg'lik dozda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar.	33
Resim 5. 2 µg /ml'lik NaOCl dozunda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar, birleşme bölgeleri ve 1 ve 2 nolu kromozomların kısa kolları arası birleşme.	34
Resim 6. 1 µg /ml'lik dozda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar.Kromatid birleşmeleri.	35
Resim 7. NaOCl' nin bazı dozlarında görülen poliploid yapılara bir örnek.	35

TABLULARIN LİSTESİ

Sayfa no

Tablo 1. NaOCl' nin değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürü kromozomlarında kromozom aberasyonu sıklığı.	36
--	----

1.GİRİŞ

İnsan ve canlı yaşamı için hayati öneme sahip olan suyun kullanılabilir olması için tehlikeli kimyasallardan ve bakterilerden temizlenmiş olması gereklidir. Ayrıca derelerden ırmaklardan ve göllerden alınarak yerleşim yerlerindeki insanların kullanımına sunulan su belirli standartlara uymak zorundadır. Aksi durumda kullanılması tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir. Yerleşim yerlerinin ve fabrikaların atık suları derelere veya göllere bağlanmaktadır. Günümüzde teknolojinin gelişmesi, nüfus artışı gibi etkenlerden dolayı su kaynakları olan dereler, göller ve yeraltı suları aşırı kirlenme ile yüz yüze kalmaktadır.

Değişik amaçlarla, birçok temizlik işinde kullanılan çamaşır suları içerdikleri kimyasallar nedeniyle kullanıcılarda zararlı etkiler ortaya çıkarabilmektedir. Temizlik işlemi, mineral ve inorganik tuzların kimyasal reaksiyonlar sonucu çözünmesi, kir ve yağların yüzeylerden uzaklaştırılması olarak tanımlanabilir. Temizlik maddeleri dünyada çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Çamaşır suyunun yaygın kullanımı ve içerdiği kimyasallarla maruziyet sonucu allerji, egzama, astım gibi yan etkiler ortaya çıkarabilmektedir.

Çamaşır sularında bulunan en önemli kimyasal maddelerden biri de sodyum hipoklorittir. Sodyum hipoklorit temizlik, dezenfektasyon gibi amaçlarla yaşantımızın birçok alanına girmiştir. Temizlik ve dezenfeksiyonda kullanılan ürünler yutulma, cilde temas ve hatta eşyalara temas durumunda tehlike arz etmektedir. Bu tür kimyasalları kullanırken dikkatli davranılmalıdır.

Klorlu çamaşır suları çoğunlukla mikrop öldürücü olarak kullanılır. Mikropları öldüren oksitleyici çamaşır sularıdır. Evlerde ve hastanelerde bu amaçla en yaygın olarak kullanılan kimyasal madde sodyum hipoklorittir ve hücre zarları ile hücre proteinlerine etki eder. Çamaşır suyu üretimi ülkemizde büyük küçük birçok firma tarafından yapılmakta olup, üretim sırasında işçiler kimyasallarla direkt olarak etkileşim içinde olmaktadır. Birçok insan, gerek üretim sırasında gerekse kullanım sırasında bu kimyasalların etkilerine maruz kalmaktadır.

Sodyum hipokloritin genotoksik etkileri üzerine yapılan çalışmalar, genellikle içme suyu ve değişik su örneklerinde bulunan sodyum hipokloritin çeşitli canlılar üzerindeki genotoksik etkilerini araştırmak üzere yapılan çalışmalardır. Sodyum hipoklorit ile ilgili

olarak insan ve memeli hücreleri üzerine olan genotoksik çalışmalar ise in vitro çalışmalardır ve bulunan sonuçlar genotoksik potansiyele sahip olduğu yönündedir.

Antiseptik ve dezenfektanlar, hastaneler ve sağlık merkezlerinde topikal olarak ciltte, sert yüzeylerde ve tıbbi ekipmanlarda yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal maddelerdir. Temizlik ürünleri ise; evler, okullar, iş yerleri ve hastanelerde kullanılan deterjanlar, alkali/asit maddeler, dezenfektanlar ve çözücülerden oluşan kimyasal maddelerdir [1-7].

Hem dezenfektanlar hem de temizlik ürünleri hastane ve hastane dışı yaşam alanlarında infeksiyonların engellenmesinde ve halk sağlığında önemli rol oynamaktadır. Ancak infeksiyonlar engellenmeye çalışılırken bu tür ürünlerin içerdikleri kimyasallar nedeniyle kullanıcılarda zararlı yan etkiler ortaya çıkardığı gibi, aynı zamanda kullanılan yüzeyler ve cihazlarda hasarlara neden olup ekonomik kayıplara yol açabilmektedirler. Temizlik ve dezenfeksiyonda kullanılan ürünler genellikle cilde temas veya buharlaşma sonrası solunum yolu ile alınmasıyla insanda çeşitli yan etkiler oluşturmaktadır. Ciltte oluşturdukları basit irritasyon-dan karsinojeniteye kadar değişen spektrumda yan etkiler gözlenmektedir. Bu nedenle temizlik ve dezenfeksiyonda kullanılan kimyasalların yarar zarar etkileri göz önünde bulundurulmalı ve bu ürünler bilinçli kullanılmalıdır [1].

Her hücrede genom, genomik DNA'nın çeşitli gruplara ait kromozomal proteinlerle birleşmesinden oluşan kromatin halinde paketlenir. Kromatinde bulunan proteinlerin bazıları yapısal rol oynarken diğer bir kısmı gen ekspresyonunu düzenler. Hücre bölünmesi sırasındaki hariç, kromatin hücre çekirdeği içinde dağılmış vaziyettedir ve mikroskop altında oldukça homojen bir görünüme sahiptir. Bununla birlikte, hücre bölünürken çekirdek materyali yoğunlaşır ve mikroskobik olarak görülen kromozomlar belirir. Kromozomlar sadece bölünme sırasında görülen özel yapılar olmasına rağmen bütünlüklerini bölünmeler esnasında korurlar[2].

Canlı vücudunun başlıca yapı taşı hücredir. Bir insanın vücudunda trilyonlarca (70 kg'lık bir insan vücudunda ise 70 trilyondan fazla) hücre bulunmaktadır. Bu hücrelerin her birinin çekirdeğinin içinde bulunan DNA molekülü, kendi eksenini etrafında

kıvrılarak yükselen bir çift spiral yapıdadır. Mesela, bir insan vücudundaki bütün DNA moleküllerini çözerek arka arkaya dizersek, dünya ile güneş arasında 400 defadan fazla gidip gelinebilmektedir. Bir organizmaya ait bütün bilgiler DNA moleküllerinde 4 özel nukleotidin (A,T,G ve C) diziliş sırasına göre kodlanmıştır. Bir insana ait DNA molekülünde yaklaşık 3.5 milyar nükleotid yani 3.5 milyar harf bulunmaktadır. Diğer bir deyişle 46 kromozomlu bir insan hücresindeki DNA molekülleri "her cildi 20000 sayfalık 46 cilt dev bir ansiklopediye" benzemektedir. DNA üzerindeki bu bilgiler gen adı verilen özel bölümlerde yer alır. Bir organizmanın vücudunda ise on binlerce gen bulunur ve her bir organ farklı sayıda gen tarafından kontrol edilir. Mesela, yine insan vücudunda 50000 den fazla gen bulunur ve bunlardan 29930 tanesi beyinde görev yapar [2].

Sitogenetiğe olan ilginin artmasının bir başka nedeni ise, bilhassa insanlarda kongenital (nedeni çevresel ya da kalıtsal da olsa doğuştan var olan) hastalıkların doğumdan önce tanınmasıdır. Yine sonraki kuşakta daha az zarar vermesini sağlaması bakımından yapılan çalışmalar, yani "genetik danışmanlık" artık ayrı bir ilgi ve uygulama alanı olmuştur[2].

Bireyin kalıtsal özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayan genetik şifre, herhangi bir nedenden dolayı (X ışını, radyasyon, ultraviyole, bazı ilaç ve kimyasallar, ani sıcaklık değişimleri vb. maddelerle) bozulabilir. Bu durumda DNA'nın sentezlediği protein veya enzim bozulur. Böylece canlının, proteinden dolayı yapısı, enzimlerinden dolayı metabolizması değişebilir. Bir gen mutasyona uğradıktan sonra kararlı hale gelir ve tekrar tekrar eski haline dönmek için herhangi bir eğilim göstermez. Mutasyon terimi genel olarak, kromozom yapısının değişmesini, kromozom sayısının değişmesini ve genlerdeki değişiklikleri kapsar.

İnsanlığın kullanımına sunulmuş 2 milyon çeşitten fazla kimyasal madde mevcut olup, bunlara her yıl ortalama 2.000 - 4.000 yeni kimyasal madde eklenmekte ve kullanıma sunulmaktadır [8].

Bu maddelerin yanlış kullanılmaları, maddeye maruz kalan insanlarda ciddi hastalıkların oluşmasına ve kanser vakalarının artmasına sebep olduğu bilinmektedir. Bu maddeler insanlarda tedavisi mümkün olan geçici rahatsızlıklar yapabildiği gibi, en

önemlisi ve en tehlikelisi olan, ayrıca tedavisi de olmayan kalıtsal yapıda oluşturabilecekleri DNA hasarları da ortaya çıkartabilirler. Kişinin DNA'sının zarar görmesi, kansere yatkınlığının artması demektir. Kimyasal maddelerin insan kromozomlarında oluşturduğu hasarlar kısa süreli genotoksite testleri ile belirlenebilmektedir.

Bu çalışmada, insan lenfosit kültürü yöntemi ile, sodyum hipokloritin insan kromozomunda genetik hasar oluşturup oluşturmadığını belirlemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dezenfektanlar

Mikroorganizmalar, tüm canlılar gibi uygun ortamlar bulduklarında beslenerek çoğalır. Toprak, hava, insan vücudu ve tüm çevremizde yer alır. Tıbbi ve cerrahi girişimler sırasında mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla üretmek istediğimizde, kullanacağımız araç-gereç, besiyeri gibi ortamların mikrop taşımamasını isteriz. Ayrıca içtiğimiz suyun, tükettiğimiz yiyeceklerin ve içeceklerin hastalık yapıcı mikroplardan uzak olması, aynı zamanda ameliyathane, diyaliz, yoğun bakım, transplantasyon ve yeni doğan bebek ünitelerinin de hava ve donanım malzemelerinin belirli standartlara uyması gerekir. Dirençli mutantlar oluşturabilen, çevre şartlarına uyan sporlu şekillere dönüşebilen mikroorganizmaların, istenmediği durumlarda tamamen veya kısmen yok edilmesinin gerekliliği ortaya çıkmış olmaktadır [10-12].

Mikroorganizmaları etkisiz hale getirmek veya yok etmek için antiseptik, dezenfektan ve sterilanların doğru seçimi ve prosedürlerinin doğru bir biçimde uygulanabilmesi hastanelerde etkili bir infeksiyon kontrol programının en önemli parametrelerindendir. Nesnelere veya canlı dokulardan patojen mikroorganizmaların temizlik, dezenfeksiyon, sterilizasyon ve/veya antisepsi ile uzaklaştırılması işlemi dekontaminasyon olarak tanımlanır. Sterilizasyon, mikrobiyal yaşamın tüm formlarının fiziksel veya kimyasal yöntemler uygulanarak tamamen yok edilmesidir. Dezenfeksiyon ise cansız nesnelere üzerinde bulunan potansiyel olarak patojen mikroorganizmaları elemeye eden, endosporları etkilemeyen, hastanelerde sıklıkla dezenfektan adı verilen kimyasal maddelerle, bazen de mekanik temizlik ve ısı uygulamaları ile gerçekleştirilen bir yöntemdir [10-12].

İngiliz Standartları Enstitüsü (BSI) dezenfeksiyonu açıklarken söz konusu cansız nesnelere üzerinde veya ortamdaki tüm mikroorganizmaların ölmesinin gerekmediği ancak kullanım amacına uygun olarak miktarların kabul edilebilir bir seviyeye düşürülmesinin gerekli olduğu bir işlem olduğunu ifade etmiştir. Amaçlanan dezenfeksiyon seviyesi ise sağlığa ve nesnelere zararın olmadığı bir seviyedir. Dezenfektan, dezenfeksiyon işleminde kullanılan kimyasal maddelerdir. Bunların belirli

konsantrasyonlarıyla 30 dakikadan kısa süre temas, genellikle bakteri sporları hariç tüm mikroorganizmaları öldürebilmektedir. Bu ürünlerin benzer konsantrasyonları ile özellikle bakteriyel ve fungal sporlar dâhil tüm mikrobiyolojik formları 6–10 saatlik uygulama sonrası tahrip eden kimyasal maddeler ise kimyasal sterilanlar olarak tanımlanır. Germisid ise, dezenfektan ile benzer bir anlam taşımasına rağmen, hem canlı dokuya, hem de cansız nesnelere uygulanabilen kimyasal ajanlar olarak ifade edilir. Sonuna ‘*sid*’ eki ilavesi ile ön ekte belirtilen mikroorganizmayı yok eden bileşikleri ifade eder: Örneğin, tüberkülosid, bakterisid, virusid, fungusid, sporosid [10-12].

2.1.1. Dezenfeksiyonu Etkileyen Faktörler

Sterilizasyon ve dezenfeksiyonu etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi, bu konudaki doğru seçim ve uygulama sonuçta infeksiyon riskini minimize etmeyi sağlar. Bunlar; dezenfektanın tipi, kullanım konsantrasyonu, temas süresi, ortamın pH’si, ısısı, ortamda organik maddelerin varlığı ve miktarı, nesnenin yapısı, nispi nem ve suyun sertliği ile mikroorganizmanın yapısı, miktarı ve üreme periyodu gibi mikroorganizmaya bağlı faktörlerdir. Bunlardan mikroorganizmayı çevreleyen kan, mukus, serum, dışkı, doku artıkları ve benzeri organik artıklar dezenfeksiyonu olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörleri oluşturur. Dezenfeksiyon veya sterilizasyona maruz kalan nesnenin düzgün, porsuz bir yapıya sahip olması etkiyi artırırken yüzeylerinde çatlak, por veya eklentinin varlığı uygulamayı olumsuz yönde etkileyebiliyor[3].

İdeal bir dezenfektana ait özellikler şöyle sıralanabilir[3].

- Tüm mikroorganizmaları öldürebilmelidir.
- Stabil olmalıdır.
- Toksik olmamalıdır.
- Hızlı etki edebilmelidir.
- Nötral pH’ de suda çözünebilmelidir.
- Renksiz ve kokusuz olmalıdır.
- Herhangi bir pH’ de aktif olabilmelidir.
- Uygulanacağı eşyaya zarar vermemelidir.
- Sıradan temizlik araçları ile geçimsiz olmamalıdır.
- Çevreye zarar vermemelidir.

- Organik ajanlarla aktivitesi kaybolmamalıdır.,
- Ucuz ve kullanımını kolay olmalıdır.

2.1.2.Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar

Genelde bakteriyel endosporlar hariç mikroorganizmaların tümünü >20 dakikada öldüren dezenfektanlar bu gruba girer. Ayrıca kimyasal sterilanlar olarak bilinen az sayıdaki dezenfektanlar 6–10 saat gibi uzun uygulama süresi gerektirmekle birlikte uygulama sonrası bakteriyel endosporları da öldürebildiklerinden yüksek seviyeli dezenfektanlar olarak değerlendirilmektedir. Bunlar arasında glutaraldehid (%2), formaldehid (%3–8), sodyum hipoklorit (1000 ppm serbest klor), perasetik asid (\leq %1,%0,001–0,2) ve hidrojen peroksit (%3–6 veya %6–25) yer alır [3].

2.1.3. Orta Seviyeli Dezenfektanlar

Bu grup, bakteri endosporları hariç tüberküloz basili ve diğer mikroorganizmalara \leq 10dakikada etkili dezenfektanları kapsar. Sıklıkla kullanılan orta seviyeli dezenfektanlar ve kullanım konsantrasyonları; etil veya izopropil alkol(% 60–90), fenol ve fenol bileşikleri (% 0,4–5), iyodoforlar (30–50 ppm serbest iyot) dır[3].

2.1.4. Düşük Seviyeli Dezenfektanlar

Bakteri endosporları ve tüberküloz basiline etkili olamayan, vejetatif bakterilerin çoğunu, bazı mantarları ve uygun bir sürede (\leq 10 dakika) bazı virüsleri öldürebilen dezenfektanlardır. Uygulamada sıklıkla kullanılan bu grup dezenfektanlar; Etil veya izopropil alkol (\leq % 50), fenol veya fenol bileşikleri (% 0,4-5), iyodoforlar (30-50 ppm serbest iyod), sodyum hipoklorit (100 ppm serbest klor) , dört değerli amonyum bileşikleri dir[3].

2.2. ÇAMAŞIR SUYU

Bir maddeyi beyazlatmak veya ağartmak, onun rengini çıkarmak veya açmaktır. Çamaşır suyu, oksidizasyon yoluyla bu etkileri yapan bir kimyasal maddedir. Bilinen kimyasal çamaşır suları (beyazlatıcılar, ağartıcılar), hidrojen peroksit içeren “sodyum

hipoklorit (NaOCl)" (veya klorlu çamaşır suyu ve oksijenli çamaşır suyu) veya peroksit bulundurmayan sodyum perborat veya sodyum perkarbonat gibi bileşiklerdir. "Beyazlatıcı toz" kalsiyum hipoklorittir (Ca[OCl]₂). Beyazlatma (ağartma), tekstil sanayisinde boyama işleminin ilk adımı olarak değerlendirilir. Çamaşır suları 2 sınıfa ayrılır. İlki "Klorlu amaşır suları", ikincisi "Oksijenli amaşır suları"dır. Evde kullanılan çamaşır suyu veya sodyum hipoklorit, çamaşırları beyazlatmak, kirlerini çıkartmak ve mikroplardan arındırmak için kullanılır. Çamaşır suyunun etken maddesi olan sodyum hipokloritin oranı % 5.25'dir. Çamaşır sularını mikrop öldürücü ve koku giderici olarak da kullanırız. Oksitleyici amaşır suları hücre zarlarını ve hücre proteinlerini etkileyerek mikropları öldürür. Evlerde ve hastahanelerde bu amaçla en yaygın kullanılan sodyum hipoklorittir. Kalsiyum hipoklorit, içme suları ve yüzme havuzlarının mikroplardan arındırılması için kullanılır. Eğer beyazlatıcı, bir asitle temas ederse klor gazı açığa çıkar. Bunu önlemek için, pH değerini yüksek tutmak amacıyla (pH 12), ticari beyazlatıcılara ayrıca alkali maddeler eklenir.

2.3 KLOR SALAN BİLEŞİKLER

Antimikrobiyal aktiviteye sahip birçok klor bileşiği ticari olarak bulunmaktadır. Bunlar arasında sodyum veya kalsiyum klorit, sıvı klor, klor dioksit ve inorganik/organik kloraminler sayılabilir. Etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamasına karşın klorun hücredeki anahtar enzimatik reaksiyonları engelleyerek ve protein denatürasyonu oluşturarak dezenfeksiyonu sağladığı kabul edilmektedir [5]. Klorin ve klor salan bileşikler orta düzey dezenfektanlar arasında guruplandırıldığı gibi, bazı kaynaklarda konsantrasyona bağlı sporosidal ve mikobakterisidal etkilerinden dolayı yüksek düzey dezenfektanlar gurubunda da gösterilmektedir. Klorin bileşiklerinin farklı bileşikleri ticari olarak bulunmaktadır. Klor salan maddelerden en iyi bilinenleri sodyum hipoklorit, klorin dioksit, sodyum dikloroizosiyanat ve kloramin T bileşikleridir. Hipoklorit en yaygın olarak kullanılan şeklidir. Hipoklorit bir yüzyıldan daha fazla kullanılan ve günümüzde de tercih edilen bir dezenfektandır[9].

Bu maddeler oldukça aktif oksidize edici maddelerdir ve bu şekilde proteinlerin hücresel aktivitesini bozarlar; nükleotid bazların klorlanmış türevlerini oluşturarak bakteri DNA'sı üzerine etki ederler. Klor salan maddeler yüksek dozlarda sporisit etki yapar. Spor mantosunun permeabilitesini artırır. Bu maddelerle muamele sonrası spor

refraktivitesini kaybeder, spor mantosu, korteksten ayrılır ve lizis oluşur. Klor salan maddeler virüs etki de gösterir. RNA'yı parçalama, kapsidin bozulması gibi olası etki mekanizmaları düşünülmele birlikte bu konuyla ilgili daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır[9].

Hipoklorit solusyonunun düşük pH'ta, yüksek ısıda ve yüksek konsantrasyonda mikrobisidal etkisi artar. Düşük konsantrasyonda (100 ppm) vejetatif bakteri, mantar ve virüsleri öldürürken, yüksek konsantrasyonda (500-1000 ppm) sporosidal ve tüberkülosidal etkide bulunur. Bu nedenle yarı kritik aletlerin yüksek düzey dezenfeksiyonunda kullanılabilir. Hipokloritin hızlı etki göstermesi, boyama ve yanıcı özelliğinin olmaması ve ucuz elde edilmesi olumlu özelliğidir. Bununla birlikte metaller üzerindeki korozif (aşındırıcı) etki göstermesi, organik maddelere bağlı stabilitesini kaybetmesi önemli olumsuz yanıdır[9].

Sodyum hipokloritin kullanım konsantrasyonu değişmele birlikte, hastanede bazı seçilmiş yarı kritik araçların yüksek düzey dezenfeksiyonu (dental cihaz ve kardiyopulmoner resüsitasyon cihazları), hemodiyaliz cihazları gibi aletlerin orta düzey dezenfeksiyonu, çevre ve banko temizliğinde olduğu gibi düşük düzey dezenfeksiyon amacı ile kullanılır [9].

Hipoklorit geniş spektrumu, hızlı bakterisidal etkisi, suda çözünebilmesi, kolay kullanımı, uygulanma konsantrasyonlarında insanlara olan toksik etkisinin göreceli olarak azlığı, çoğunlukla toksik maddelere ayrışmaması ve ucuzluğu ile ideal ve güvenilir dezenfektanlar arasındadır. Ancak mukoz membranlara irritan etkisi, bazı kimyasallarla etkileşime girerek klor gazının ortaya çıkması, organik madde varlığında etkisinin azalması ve metaller üzerindeki zararlı etkileri dezavantajları olarak göze çarpmaktadır. Doğal ve atık sulardaki organik birleşiklerle etkileşime giren klor gazının organohalid oluşumuna yol açması sağlık açısından endişe uyandırmaktadır. Sağlık açısından endişe verici olan diğer bir durum da sodyum hipokloritin depolanması ve kullanımı sırasında az miktarlarda klorlu organik bileşiklerin ortaya çıkmasıdır. Evlerde kullanılan sulandırılmamış hipoklorit ürünlerinde klorun %1-2'si atık sularla karıştığında klorlu organik bileşikler oluşur. Klorlu bileşikler yarar-zarar dengesi gözetilmek suretiyle kullanılmalıdır[6].

Sodyum hipoklorit ve benzer bileşikler, maruziyet süresine ve bileşiğin türüne göre ciltte hafif irritasyondan açık nekrozlara kadar değişebilen yan etkiler ortaya çıkarır. Sodyum hipoklorite maruziyet konjunktiva, solunum ve sindirim sisteminde irritasyona neden olabilir. Klor bileşiklerine bağlı yaralanmalar direkt temas (konsantre solüsyonlar), sodyum hipokloritin yutulması ve klor gazı solunmasına bağlı olarak ortaya çıkabilmektedir. Hipoklorit asitlerle etkileşiminde klor gazı, amonyakla etkileşiminde ise kloramin ortaya çıkar. Klor gazına maruziyet öksürük, nefes alamama, dispne ile beraber mukoz membranlar ve solunum yollarında irritasyona neden olabilir. Medina-Ramon ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada özellikle ev temizliğinde çamaşır suyu kullanımı sırasında ölçülebilir miktarda klor gazının açığa çıktığı saptanmış, temizlikçi kadınlarda ortaya çıkan solunum yolu şikayetleri ve astım belirtileri bu gazın etkilerine bağlanmıştır . Gaza ciddi maruziyet ise kimyasal pnömoni ve akciğer ödemi gibi klinik tablolarla son bulabilir. Piyasada satılan % 5.25 NaOCl olan çamaşır suyundaki var olan klor 52.500 ppm'dir. Çamaşır suyunun 1/10 sulandırılmış solüsyonu 5.250 ppm ; 1/100 sulandırılmış solüsyonu 525 ppm klor içerir [6].

2.3.1. Konsantrasyonunda Ortaya Çıkan Etkiler

- 1-3 ppm Mukoz membranlarda orta derecede irritasyon
- 5 ppm Gözlerde irritasyon
- >15 ppm Boğazda irritasyon
- 15-30 ppm Öksürük, nefes alamama, yanma hissi
- >50 ppm Pnömoni
- 430 ppm 30 dakika içinde ölüm
- >1000 ppm Dakikalar içinde ölüm.

Klor verici dezenfektanların kullanım amaçlarına göre var olan klor miktarlarını şöyle örneklendirebiliriz.

<u>Var olan klor (ppm)</u>	<u>Kullanım amacı</u>
0,5-1	İçme suyu

4-6	Hidroterapi havuzları
125	Biberonlar
1000	Kontamine yüzeyler
10.000	Kan-vücut sıvıları döküntüleri

Klor verici dezenfektanların kullanım amcına uygun hazırlanmasına yönelik olarak şöyle örneklendirebiliriz.

<u>Klor verici</u>	<u>Kullanım amacı</u>	<u>Sulandırma</u>	<u>Var olan klor</u>
<u>dezenfektan</u>			
Çamaşır suyu %5 sodyum hipoklorit 50.000ppm	Kan ve vücut sıvısı döküntüsü silme, temas süresi 10 dak.	9 kısım su+1 kısım çamaşır suyu	%0.5 5000ppm
	Yüzey dezenfeksiyonu, temas süresi 5 dak.	50 kısım su+1 kısım çamaşır suyu	%0.1 1000ppm
	Gıda yüzeyleri temas süresi 2 dak.	200 kısım su+1 kısım çamaşır suyu	%0.025 200 ppm

2.4. SODYUM HİPOKLORİT

2.4.1. FİZİKSEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLER

Molekül Ağırlığı	: 74.45
Fiziksel Görünüş	: Temiz yeşilimsi sarı
Renk	: Yeşilimsi sarı
Koku	: Kuvvetli klor kokusunda
Kaynama Noktası	: %15'lik çözelti için 110 ⁰ C. 40 ⁰ C'de yavaşça NaCl, NaClO ₃ oluşturarak bozular.
pH	: > 12
Yoğunluk	: Mevcut değil
Suda Çözünürlük	: 26 gr/100 gram

Sodyum hipoklorit gibi bir oksitleyici çamaşır suyu, renk yapıcı kimyasal bağların parçalanmasıyla işlevini yerine getirir. Bu parçalanma, molekülü, renk yapıcı içermeyen veya görünen ışığı soğurmayan bir renk yapıcı içeren farklı bir yapıya dönüştürerek yapar. Sodyum hipoklorit kuru, soğuk yerlerde gün ışığı ve yanıcı maddelerden uzakta depolanmalı, havalandırılmalı kaplar kullanılmalı, depolama sıcaklığını 29 °C'nin altında tutulmalıdır. Sodyum hipokloritin sınırlı raf ömrü yüzünden uzun süre depolanması olanaksızdır.

Piyasada bulunan sodyum hipoklorit aynı zamanda sodyum hipoklorit eriyiği olarak da adlandırılır. Alkali ve tahrip edici bir eriyiktir. Uygun bir sodyum hipoklorit çözeltisi içinde %12-15 klor vardır [12]. Sodyum hipoklorit yanıcı değildir fakat asidik ortamda, ısı ve ışık etkisiyle bozunur. Kaplarda basınç varsa ısıtıldığında yada asit gazları ile temasında infilak edebilir. Yükseltgen organik maddelerle yangınla sonuçlanabilen şiddetli reaksiyonlara girer. 40°C'in üstündeki sıcaklıklarda, gün ışığında ve asitlerle teması halinde stabil değildir. Asitlerle reaksiyonunda klor; nikel, bakır, kalay, manganez ve demirle reaksiyonunda oksijen; yüksek sıcaklıkta sodyum klorat ve sodyum klorür gibi tehlikeli bozunma ürünleri verir. Yutulduğu takdirde ağızda ve

boğazda yanıklar, şiddetli bulantı krampları, kusma, nefes almada sıklık, şoka yol açar. Şiddetli kas spazmı, koma yada ölüme yol açan sodyum hipoklorit Amerikan ulusal toksikoloji programı uluslararası kanser araştırma ajansı veya işçi sağlığı ve iş güvenliği yönetimince kanserojen olarak nitelendirilmemiştir [12]. Sodyum hipoklorit çamaşır sularının içinde ortalama %5 oranında bulunmaktadır. Bu tür çamaşır sularından 1 lt suya 2-3 damla; yada 1 teneke suya 1 çorba kaşığı ilave etmek içme sularının dezenfeksiyonu için yeterlidir. Sodyum hipoklorit, Avrupa tehlikeli maddeler listesinde koroziv olarak adlandırılmıştır. Dartar-Öztan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada %5.25'lik sodyum hipoklorit solüsyonunun paslanmaz çelikten yapılmış dental ekipmanlarda korozyona sebep olduğunu göstermişlerdir. Korozyonun solüsyonda bulunan aktif klor iyonlarından kaynaklanabileceğini ve olayda paslanmaz çeliğin %70'ini oluşturan demirin klora dayanıklı olmamasının rol oynayabileceğini belirtmişlerdir[9].

Klor çok iritan bir gazdır. Trakeabronşiyal sistem ve akciğer parankimine zarar verebilir. Hayvan çalışma bulguları, klorun hidroklorik asitten 33 kat daha iritan olduğunu göstermiştir. Etkisi yoğunluğuna, maruziyet süresine ve hücre içi/hücre dışı su içeriğine bağlıdır. Genellikle kısa süreli maruziyetlerde 3 ppm'den az değerler tolere edilebilir. Ancak 1 ppm dünyada standart maruziyet dozu olarak kabul edilmektedir. Toksisitenin temel mekanizması su bulunan ortamlarda hidroklorik ve hipoklorik asit oluşturarak çözünmesi ve sonrasında iyonlaşmasıdır. Bu reaksiyon vücutta nemli hava yolları gibi bölgelerde de meydana gelebilir. İyonlar hücre duvarını geçerek serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Bu iyonlar ve serbest radikaller hücre içine girdiklerinde fonksiyonel gruplarla etkileşime girerek kloramin ve okside sülfür içeren gruplar oluştururlar. Amonyak gibi hızlı çözünen gazlar üst solunum yollarını irrite eder ve mukosilyer klerens ile akciğerlerden uzaklaştırılırken, yavaş çözünen klor akciğerin derin kısımlarına kadar ulaşır [5].

Hipokloritler, klorlu dezenfektanların en eski, en çok kullanılan, en ucuz, kolay sağlanan ve hızlı etki eden şekilleri olup sıvı (örneğin: sodyum hipoklorit) veya katı (örneğin: kalsiyum hipoklorit, sodyum dikloroizosiyanat) halde bulunurlar. Geniş bir etki spektrumları vardır (bakterisit, fungusit, tüberkülosit, virüsit ve sporosit).Ev temizliği, süt endüstrisi ve yüzme havuzlarında kullanılırlar. Dezavantajları aşındırıcı olmaları (metalleri), organik madde varlığında inaktive olmaları ve dayanıksız

olmalarıdır. Dezenfekte edilecek yüzeylerdeki organik madde miktarına bağlı olarak 1/10-1/100'e kadar sulandırılır. Sodyum hipokloritin %5.25'lik stok çözeltisininin 1/10'luk solusyonu yaklaşık 5000 ppm serbest klorla eşdeğer gelmektedir. Bu çözelti yere dökülen, etrafa sıçrayan kanların dezenfeksiyonu için Centers for Disease Control (CDC) tarafından önerilmektedir. Oldukça temiz yüzeyler için 1000 ppm aktif klor yeterlidir. pH=8 olan musluk suyu ile taze hazırlanan ve kapalı opak şişelerde oda derecesinde saklanan NaOCl stabilitesini bir ay korumaktadır. Ancak bir ay içerisinde sık sık ağzı açılırsa aktif klor konsantrasyonu azalmaktadır.

Sodyum hipoklorit, genellikle yeşilimsi sarı solüsyondur ve katı olarak bulunmaz. NaOCl, sıvı ya da gaz klor yani klor elementi ile kostik soda = sodyum hidroksit (NaOH)'ten soğutularak elde edilir: Sodyum hipoklorit, bir zayıf asitin tuzu olduğundan hipoklorit iyonları hipokloröz asitle bir eşitlik sağlar ve hipoklorit iyonlarının konsantrasyonu pH'daki artışla artar. Bu nedenle stabil kalması için sodyum hipoklorit solüsyonları alkalidir. Sodyum hipoklorit solüsyonlarından yüksek konsantrasyonlarda ve pH > 8'de aktif klor, hidrokloröz asit (HOCl) salınması güçtür [10]. Solüsyonun pH'ı var olan hipoklorit iyonlarının konsantrasyonuna bağlıdır. Sodyum hipoklorit solüsyonları sodyum klorat ve hidroklorik asit oluşturacak şekilde göreceli olarak parçalanır. Sodyum hipoklorit solüsyonu asitlerle karıştırılmamalıdır; bu durum hızla klor gazı salınımına yol açar. Amonyak ya da amonyum bileşikleriyle karışımı da patlayıcı olabilir; tehlikeli miktarda klor ya da kloramin salınabilir. Bu nedenle idrar döküntüsünün temizliği için kullanılmamalıdır. Aseton ve formaldehit gibi bazı organik bileşikler sodyum hipoklorit solüsyonuyla şiddetli reaksiyona girer. Benzer olarak organik kontaminasyon solüsyonun etkisiz kalmasına yol açar. Antimikrop etkinlik organik madde miktarı oranında azalma gösterir. Bu nedenle dezenfeksiyonda var olan klor konsantrasyonu harcanandan etkilenmeyecek kadar yüksek olmalı ve antimikrobik etkinlik için yeterli klor sağlanmalıdır. Hipokloritlerin ışığa maruz kalmaları klorid ve oksijen oluşumuyla yıkıma neden olacağından solüsyonların ışığı geçirmeyen kaplarda saklanmaları gerekir [11,12].

Ağır metaller de aynı şekilde hipokloritlerin parçalanmasına neden olduğundan aşınmaya uğramayacak kaplarda saklanmalıdır.

2.5. ÇAMAŞIR SUYUNUN TARİHÇESİ

Keten bezlerin beyazlatılması, eski çağlarda Yunanlılar, Romalılar, Mısırlılar ve Fenikeliler arasında bilinmektedir; fakat bunun nasıl başarılı olduğu tam olarak açık değildir. Modern çamaşır suları geliştirilmeden önce, kumaşlar genellikle bir dizi tekrarlanan kaynatma ve kül suyu, üre, potas, sülfürik asit ve yağı alınmış süt içeren asidik ve alkali maddelerle ıslatma işlemleri ile beyazlatılırdı. Keten bezi genelde güneş ışığına maruz bırakılarak beyazlatılırdı.

- MÖ 5000: Mısırlılar, giyecekleri beyazlatmak için yıkayıp güneşte kurutmadan yararlanırlardı.
- MÖ 3000: Çamaşır suları çoğunlukla tahta küllerinden türetilirdi. Suyu karıştırılarak kül suyu oluşturulurdu. Eğer çamaşır belirlenmiş süre kül suyu ile ıslatılır ve güneşte kurutulursa mükemmel bir beyazlık elde edilirdi. İşlem kumaş üzerinde zararlı bir sonuç oluşturmayacak şekilde gözle takip edilerek tekrarlanırdı.
- MS 1000-1200: Hollandalılar, Avrupa toplumunun çamaşır uzmanı oldular. Sırlarını açıklamaksızın, tahriş edici etkisini azaltmak için ekşimiş sütü, kül çözeltisine eklediler. Bu, ıslatma ve güneşte kurutmanın, kül suyunun tek başına kullanıldığı zamanlara göre daha fazla tekrarlanabilme imkânı anlamına geliyordu. Fakat işlem 8 hafta sürüyordu ve çamaşırını güneşte kurutmak için serilecek geniş alanlar gerektiriyordu.
- MS 1200: Çamaşır suyu (Bleach) kelimesi İngilizce sözlüklerde ilk kez yer aldı.
- 1756: Edinburglu bilim adamı Francis Home, ekşimiş süt yerine seyreltik sülfürik asitin beyazlatma süresini 12 saate kadar kısalttığını buldu.
- 1772: Almanya doğumlu İsveçli kimyacı Karl Wilhelm Scheele, modern çamaşır sularının ana maddesi olan kloru ilk kez keşfetti. Yaklaşık 40 yıl sonra İngiliz kimyacı Sir Humphrey Davy Yunanca'da yeşilimsi sarı kelimesinden türetilen "klor" ismini verdi.
- 1785: Evde kullanılan çamaşır suyundaki etken madde olan sodyum hipoklorit, Fransız kimyacı Claude Louis Berthollet tarafından bulundu. Berthollet'nin beyazlatıcısı kostik klorlu potas çözeltisi ile oluşturulmuştu ve ilk olarak

1789'da "Javel Suyu" olarak satıldı. Ancak her bir maddenin tam miktarının karışıma konulması zordu ve potas çok da pahalı bir maddeydi.

- 1799: İskoçyalı kimyacı Charles Tennant, Berthollet'nin klor fikrini aldı, potas yerine kireçtaşı koydu ve etken beyazlatıcı olarak kalsiyum hipoklorit ($\text{Ca}[\text{OCl}]_2$) içeren ilk çamaşır tozunu yaptı. On yıl içinde, sadece çamaşırını değil, diğer ürünleri, özellikle yazı kâğıdını da beyazlatan çamaşır tozu bütün Avrupa'da yayıldı. Ancak toz çok fazla klor içerdiği için halâ çok pahalıydı.
- 1880: Louis Pasteur, sodyum hipokloritin mikrop öldürücü özelliği olduğunu belirledi.
- 1897: Sears Roebuck & Co. firması ürün kataloğuna beş ayrı çamaşır suyunu koydu.
- 1913: Oakland-Kaliforniya'da kurulu The Electro-Alkaline Co. firması geliştirdiği bir işlemle kostik soda çözeltisinin klorlanmasıyla türetilen sodyum hipoklorit (NaOCl) çamaşır suyunu yaptı.
- 1922: Şirketin ismi Clorox Chemical (şu anda The Clorox Co.) olarak değişti ve sodyum hipokloritli çamaşır suyu 1 pint (=1/8 galon≈0,47 litre)'lik şişelerde piyasaya verildi. Bundan sonra da çamaşır tozunun yerini almaya başladı.

Bugün: Sodyum hipoklorit esaslı çamaşır suları büyük oranda çamaşır, temizlik ve suların mikroptan arındırılması alanında kullanılmaktadır[26].

2.6. SODYUM HİPOKLORİT ve GENOTOKSİTESİ

Sodyum hipoklorit, yaklaşık 100 yıldan fazla zamandır dezenfektan olarak kullanılmakta olup, birçok mikroorganizma üzerine hızlı etkili bir ajan özelliği taşımaktadır [13-19]. ($\text{NaClO} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$). Sulu solüsyonlar halinde hazırlanan bu ürün, bugün ticarete "Javel suyu" namıyla anılmaktadır. Sodyum hipoklorit, sulu solüsyon halindeki sodyum klorürün elektrolizi ile veya sodyum sülfat yahut sodyum karbonatın kalsiyum hipoklorit üzerine olan tesiri ile yahut sodyum hidroksitin (kostik sodanın) klorla muamele edilmesi suretiyle elde edilir . Bu tuz, suda çok iyi çözünür, susuz halde bulunmaz; nispeten dayanıksız ve ısı ve ışığa karşı hassastır. Sodyum hipokloritin sulu

çözeltileri renksiz veya sarımtırak renkte olup, klor kokusundadır. Genellikle, içinde, az miktarda safsızlık olarak, sodyum klorür bulunur. Bitkisel liflerin ve kağıt hamurunun rengini ağartmada, herhangi bir yerin dezenfekte edilmesinde, suyun arıtılmasında ve hidralizinin hazırlanmasında kullanılır. Ayrıca %12.5 - %25 oranında aktif klorin gazı içeren bir solüsyon olup; evsel, endüstriyel ve bilimsel araştırma alanlarında kullanımının yanı sıra biosit özellikleri ile ilgili olarak biyomedikal uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Klorin ve klorin içeren ajanlar geniş ölçüde dezenfektan olarak kullanılır. Bunlardan başka, havuz dezenfektanı olarak, fotoğrafçılıkta antihalojen neviden olan camların süratle gelişmesinde ve antiseptik olarak tıpta da kullanılmaktadır (bunun borik asit ile olan karışımı "Dakin çözeltisi" olarak bilinir). Sodyum hipoklorit su ve atık sulara eklendiğinde, protein ve nükleotid bazlarında dâhil olduğu biyolojik materyalle kolayca reaksiyona girerek çeşitli organik bileşiklerin oluşumuna neden olur, ki bu bileşikler çoğunlukla lipofilik, dirençli ve akuatik çevre için toksik özelliklere sahiptir [13-19].

Klorlama, içme suyunu dezenfekte etmek için dünya çapında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu işlem patojenik mikroorganizmalara karşı koruma sağlarken, diğer taraftan oldukça yüksek derecede toksik yan ürünler oluşturmaktadır [13]. Bu bileşikler, klorun yüzey sularında normal olarak bulunan humik ve fulvik asitle reaksiyonları sonucunda oluşur [14]. İçme suyunu dezenfekte etmek için dezenfektan olarak kullanılan sodyum hipoklorite, ratların uzun süreli maruz kalması sonucunda, dışı ratlarda lösemnin geliştiği gösterilmiştir [14]. Bazı epidemiyolojik çalışmalar, klorlu içme suyunun tüketilmesi ve üriner ve gastrointestinal bölge gibi çeşitli kanserlerin gelişimi arasında bir bağlantı olduğunu öne sürmektedir [14-16]. Üç içme suyu dezenfektanına (sodyum hipoklorit, klorin dioksit, ve perasetik asit) in situ olarak maruz kalan *Cyprinus carpio* balıklarının eritrositlerindeki MN frekanslarının değerlendirildiği bir çalışmada, sodyum hipoklorit ve klorin dioksit kullanımının karsinojenik zararlı yan ürünler oluşturabileceği ve genetik hasarın indüklendiği önerilmiştir [18,19].

Ayrıca, sodyum hipoklorit dış antiseptiği olarak da kullanılmaktadır; ve yapılan çalışmalarda, Suriye hamster embriyo (SHE) hücrelerinde sitotoksik olduğu, kromozomal aberasyonlara sebep olduğu ve kardeş kromatid değişimi (sister chromatid exchange; KKD) frekanslarını artırdığı gösterilmiştir [20,21].

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar, insanlarda birçok genetik hastalığın sebebidir. İn vivo ve in vitro mutajenite testlerinin amacı, hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amillerin belirlenmesidir. Onkogenlerde ve vücut hücrelerinde tümör supressör genlerinde değişimler sonucu oluşan kromozom mutasyonlarının ve ilişkili olayların insanlar ve deney hayvanlarında kanser oluşumuna sebep olduğu hakkında birçok delil vardır [13-16].

DNA molekülünün her canlıda benzer şekilde olması sebebiyle, canlı organizmaların bir grubu için genotoksik olan bir madde, diğer gruplar içinde genotoksiktir [25-28].

2.7. ANALİZ YÖNTEMLERİ

2.7.1. Kromozom Tipi Hataların Belirlenmesi

Yapısal kromozom hatalarının iki tipini (kromozom tipi ve kromotit tipi) kapsamaktadır. Poliploidlikteki bir artış, kimyasal maddenin sayısal hatalarda oluşturma potansiyeline sahip olacağını gösterir. Kimyasal mutajenlerin çoğu, kromotit tip hatalar oluşturur. Ancak kromozom tipi hatalar meydana gelebilir [15].

Kromozom mutasyonları ve ilişkili olaylar birçok genetik hastalığın sebebini oluşturur. Ayrıca “onkogen” lerde ve tümör engelleyici genlerde değişikliklere yol açan kromozom mutasyonları ve ilgili olayların insanlarda deneysel hayvanlarda kanser oluşmasına sebep olduğu hususunda çok önemli deliller bulunmaktadır. Kromozom hatası testleri in vivo ve in vitro olarak iki tarzda gerçekleştirilebilir [15].

2.7.1.1 İn-vivo kromozom hatası testi

İN-vivo kromozom hatası testi, türler arasında ve dokular arasında değişiklik göstermekle birlikte, özellikle in vivo metabolizma, farmakinetik ve DNA eşleme işlemi ile ilgili faktörlerin önem kazandığı mutajenik riski tayin etmek için uygulanır. Ayrıca, bir in vitro test yardımıyla belirlenmiş mutajenik bir etkinin daha fazla araştırılması içinde kullanışlıdır. Ancak, ulaşamayacağı test maddesinin veya bir reaktif bir metabolitenin hedef (kullanılacak) dokuya uzanamayacağı hususunda delil varsa, bu testi kullanmak doğru değildir. Böyle bir teste kullanılacak doku, kolaylıkla izole edilebilen ve işleme tabi tutulabilen ve hızlı hücre döngüsüne sahip hücrelerden oluşması gerekir.

Bu metod hayvanların uygun bir yol ve süre ile test maddesine maruz bırakılmasına ve bu sürenin sonunda öldürülerek hücrelerinin kromozomal hasar yönünden incelenmesi prensibine dayanır. Ancak, öldürmeden önce hayvanlar metafazda durdurma amili (örneğin; kolşisin ve kolsemid) ile muamele edilirler. Daha sonra kromozom preparasyonları yapılır, boyanır ve kromozom hatası olup olmadığını belirlemek amacıyla metafaz hücreleri analiz edilir [15].

2.7.1.2. İn-vitro kromozom hatası testi

İn-vivo'da olduğu gibi, in vitro kromozom hatası testinde, kültürü yapılan hücrelerde yapısal kromozom hatalarına sebep olan amili tespit etmek amacıyla yapılır. Bu testin prensibi, hücre kültürlerinin metabolik aktivasyonlu ya da aktivasyonsuz test maddesine maruz bırakılmasına, önceden belirlenen aralıklarda metafazda durdurulmasıdır.

İn-vitro kromozom hatası testinde, oluşturulmuş hücre hatları, hücre soyları veya primer hücre kültürleri kullanılabilir. Kullanılacak hücreler; kültürde büyütülebilirliği, karyotip kararlılığı, kromozom sayısı, kromozom farklılığı ve kromozom hatalarının kendiliğinden olan frekansı gibi özellikler dikkate alınarak seçilir [15].

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada materyal olarak sigara içmeyen yakın yaşlardaki 8 erkek (23 ve 24 yaşlarında), 8 bayandan (23 yaşlarında) alınan periferik kan ve test maddesi olarak da Sodyum hipoklorit (NaOCl) ve pozitif kontrol olarak Mitomisin C (MMC) kullanılmıştır [26].

3.1.1. Sodyum Hipoklorit

Sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu yaklaşık olarak %12,5–25 oranında aktif klorin gazı (Cl₂) içerdiğinden biosid özelliğine sahiptir. Evsel, endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır . Sodyum hipoklorit, yaklaşık 100 yıldan fazla zamandır dezenfektan olarak kullanılmakta olup, birçok mikroorganizma üzerinde hızlı ve etkili bir ajan özelliği göstermektedir. Sodyum hipokloritin antiseptik özelliği bakteri, sporlar, algler, virüsler ve hatta protozoonlar üzerine geniş etki spektrumu ile klinik pratikte çok yaygın bir şekilde kullanılmasını sağlamıştır. Sodyum hipokloritin su veya atık sularla karışması durumunda, kolayca nükleotid bazları ve proteinler gibi birçok biyolojik materyalle reaksiyona girerek stabil, lipofilik ve akuatik çevre için toksik olan organik klorinli bileşiklerin ortaya çıkmasına sebep olur.

3.1.2. Mitomisin C (MMC) (Sigma)

3.1.2.1. Mitomisin C (MMC)' nin Özellikleri

Bu çalışmada test maddesi olarak kullanılan, Mitomisin C (MMC) mavi-menekşe renkte, kristal şeklinde ve suda çözünebilir bir maddedir. Suda çözünen (pH=6-9) eriyik, ısıktan korunduğu ve 5°C altındaki buzdolabında saklandığı zaman yedi gün özelliğini korumaktadır.

Mitomisin C 2 mg ve 10 mg'lık şişelerde toz şeklinde bulunur. MMC antinoplastik (urların büyümesini önleyen) ve geniş spektrumlu bir sitostatik (hücre bölünmesini durduran) ajandır [29].

3.1.2.2. Mitomisin C (MMC)'nin Kullanım Alanları

Mitomisin C (MMC), antineoplastik ilaçlar grubuna girmektedir. Bu grupta cyclophosphamide, daunamycin, mitomycin C, streptozotocin ve uracil mustard bulunmaktadır.

Mitomisin C (MMC) çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici bir ajandır.

MMC'nin kullanıldığı kanser türleri aşağıda verilmiştir.

- Mide kanseri
- Anüs ve kalın barsak kanserleri
- Göğüs kanseri
- Küçük hücreli akciğer kanseri
- Baş ve boyun kanserleri
- Küçük mesane papillomaları
- Pankreas kanseri
- Rahim kanseri

• 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Eriyiklerinin Hazırlanması

Kimyasal Maddeler ve Çözeltiler

1.Etanol (C₂H₅OH), (Merck, K35091886 537)

2.Sodyum hipoklorit solüsyonu (NaOCl), (%6–14), (Merck, B921414 643)

3.Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄), (Merck, A651773 524)

4.Sodyum hidrojen fosfat (Na₂HPO₄), (Merck, K34623780 516)

5.Mitomisin C (MMC) 2 mg (Sigma, M 0503)

6.Giemsa (Merck, HX694620)

Fosfat Tampon Çözeltisi : Potasyum di-hidrojen fosfat (KH₂PO₄)'dan 9.1 gr. alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır. Başka bir balon jojeye de sodyum hidrojen fosfat

(Na₂HPO₄)’dan 11,9 gr alınır ve 1000 ml. bidistile suya tamamlanır ve stok çözeltiler hazırlanmış olur [2].

Sorenson Fosfat Tampon Çözeltisi: KH₂PO₄ çözeltisinden 60 ml. ve Na₂HPO₄ çözeltisinden 30 ml. alınarak şaleye konular ve üzerine 10 ml. giemsa boyası eklenmesi suretiyle %10 luk giemsa-sorenson fosfat tampon çözeltimiz hazırlanmış olur. Sorenson fosfat tampon çözeltisi çeşitli pH değerlerine ayarlanabilir, bu işlem için her iki çözeltinin değişik miktarları kullanılarak pH istenilen değere ayarlanır [2].

Çözelti 1:

KH₂PO₄..... 9.1 gr.
Bidistile su.....1000 ml.

Çözelti 2:

Na₂HPO₄.....11.9 gr.
Bidistile su.....1000 ml.

pH 5,6 için: Çözelti 2 den 5 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,0 için: Çözelti 2 den 12.3 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,5 için: Çözelti 2 den 30 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 6,8 için: Çözelti 2 den 50 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

pH 7,2 için: Çözelti 2 den 70 ml. Ve çözelti 1 den 100 ml.

3.1.3.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl) Eriyiğinin Hazırlanması

Daha önce bu konuda herhangi bir çalışma olmadığından balıklarda saptanan LC₅₀ değeri (0.5 mg/l) baz olarak alınmıştır.

Bunun için; Stok olarak hazırlanmış olan % 6- 14’lük NaOCl’ den (%6–14), (Merck, B921414 643) 12,5 ml alınıp 20 ml’ye tamamlanmış ve çözeltinin 20 ml de 1000 µg olması sağlanmıştır. Deneylere besiyeri mililitresine 50 µl gelecek şekilde verilmiş ve bu dozun alt değerleri sırasıyla kullanılmıştır. (1-50 µl/ml)

3.1.3.2. Mitomisin C (MMC) Eriyiğinin Hazırlanması

2 mg mitomisin-C bulunan ortama 2 ml steril bidistile su ilave edilerek MMC eritilmiştir. Sonra bu eriyikten 5 ml'lik kültür ortamına ilave edilerek son konsantrasyondaki MMC oranı 0.3 µg/ml olan çözeltiler hazırlanmıştır.

Yukarıda belirtilen konsantrasyonlardaki MMC ile hücreler 24 saat muamele edilmiştir.

3.1.3.3. Sorensen Tamponunun (Sorensen Buffer) Hazırlanması

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

Boyannın Hazırlanışı:

Tampon A: 11.34 gr KH_2P_4 250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4.8). Tampon B: 14.83 gr $\text{Na}_2\text{HP}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 250 ml saf su içinde eritilmiştir.

3.1.4. Kromozom Medyumu

Euroclone firmasının ürettiği (Cat. No. F 5023) kromozom, hücre kültürü için kullanılmıştır. Besiyeri içeriğinde, Non essential Amino Acids, Fetal Calf Serum, Heparin, Penicillin G, Sodium Salt, Streptomycin Sulphate, Phytohemagglutinin M bulunuyordu. Tüpler 5'er ml'lik ve hazır olarak satışa sunulmuştu.

3.1.5. Kolsişin

Kromozom preparatlarının hazırlanmasında mitotik zehir olarak Colchicine (Kolsişin) (Sigma) kullanılmıştır. Kolsişin eriyiği steril saf su içerisinde hazırlanmış ve kromozom

medyumunun her ml'sinde 0.06 µg olacak şekilde (0.06 ug/ml) 5 ml'lik kromozom medyumuna ilave edilmiştir. Kolsişin'in bazı özellikleri aşağıdadır:

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

3.1.6. Hipotonik Eriyik

Hipotonik eriyik olarak % 0, 4' lük KC1 (Merck) kullanılmıştır. Bidestile su içinde stok halinde hazırlanan eriyik ağzı kapalı cam bir kapta buzdolabında (+4 °C) saklanmıştır. Her preparasyondan yaklaşık 1 saat önce yeterli miktarda alınıp 37°C'deki inkübatörde ısıtılıp kullanılmıştır.

3.1.7. Fiksatif

Preparatların hazırlanmasında kullanılan fiksatif, 1 kısım glacial asetik asit' in 3 kısım metanol (1/3 : glacial asetik asit/metil alkol) ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. Fiksatif kullanılmadan iki saat önce hazırlanmış ve buzdolabında saklanmıştır. Her seferinde preparat yapım işleminden iki saat önce taze olarak hazırlanıp kullanılmıştır.

3.1.8. Giemsa

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

3.2. Kullanılan Deney Ekipmanları

3.2.1. Hassas Terazî

Tartım işlemlerinde 0, 0001 gr hassasiyetindeki PRECİSA XB 220 A marka terazi kimyasalların tartılmasında kullanılmıştır.

3.2.2. Santrifüj

5000 rpm'e kadar yükselebilen devir hızı, 15 dk.'lık zaman ayarlayıcı ve 8 tüp kapasiteli ELEKTRO-MAG marka santrifüj çalışmalarda kullanılmıştır.

3.2.3. Mikroskop

Koordinat cetveli ve immersiyon objektifi olan OLYMPUS marka binoküler ışık mikroskobu preparat incelemeleri sırasında kullanılmıştır.

3.2.4. Etüv

Elektro-mag M 420 Bp marka 0 °C - 100 °C ayarlanabilir etüv deneyde hücre kültürünün yapımında ve bazı eriyiklerin 37 °C'ye ısıtılmasında kullanılmıştır.

3.2.5. Deney Ekipmanları

- 1.Etüv (Elektro-mag M420 Bp)
- 2.Vorteks (Yellowline)
- 3.Mikroskop (Olympus model CHK)
- 4.Santrifüj (Elektro-mag)
- 5.Derin dondurucu
- 6.Buzdolabı
- 7.Otomatik pipet
- 8.Fotomikroskop (Olympus BH-2,Nikon Coolpix 8800)

3.3. Sarf Malzemeler

- 1.Heparin (Roche)
- 2.Giemsa (Merck, 5400512)
- 3.KH₂P0₄ (merck, 9021622)
- 4.Na₂HP0₄H₂0 (Merck, K1 690176)
- 5.Glasial asetik asit (Merck, 247K18855556)
- 6.Metanol (Merck, 502K05275408)
- 7.Ksilol (Merck, 207K037553)
- 8.İmmersiyon yağı (Merck, 09403569)
- 9.KCL (Merck, 340TA611835)
- 10.Alkol (Merck)
- 11.Distile su
- 12.Tüplük
- 13.Çeşitli cam malzemeler
- 14.Konik tabanlı 10ml'lik steril kültür tüpü
- 15.Enjektör
- 16.Çeşitli ebatlarda puarlar
- 17.Pastör pipeti
- 18.Lam
- 19.Lamel

3.4. Kromozom Anormallikleri (KA) (Chromosomal Aberration=CA) Saptamak Amacıyla Hücre Kültürünün Yapılması, Preparatların Hazırlanması ve Boyanması

3.4.1. Hücre Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Sağlıklı ve sigara içmeyen yaşları 22-25 olan kişilerden alınan, heparinize edilmiş kan örnekleri kromozom medyumlarına (5 ml) steril şartlarda 13-15 damla (0.4 ml) ekilmiştir. Hücre kültürü inkübatörde 37 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. NaOCl'in insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür süresinin bitimine 24 saat kala son konsantrasyonu kültür tüplerine ilave edilmiştir.

Pozitif control amacıyla kullanılan MMC steril bidestile suda çözülmüştür. MMC'nin insan kromozomları üzerine etkisini incelemek için kültür bitimine 24 saat kala son konsantrasyonu 0.3 µg/ml MMC kültür tüplerine ilave edilmiştir. Negatif kontrol olarak ise distile su (%1) kullanılmıştır [30].

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan Kolsişin eriyiğinden 35 µl (0.06 ug Kolsişin/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37°C'de) Kolsişin ile ön muameleye tabi tutulmuştur.

Kültür süresi olan 72. saatin bitiminde kültür tüpleri, 2000 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Dipte kalan ve hücreleri ihtiva eden 0.5-0.7 ml'lik sıvı iyice karıştırıldıktan sonra tüplere, etüvde 37 °C'de tutulan hipotonik eriyik ilave edilmiştir. Bu eriyiğin ilavesi damla damla ve karıştırılarak yapılmış olup hücre süspansiyonu pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Her tüpe 7 ml hipotonik eriyik ilave edildikten sonra tüpler, ağzı kapatılarak inkübatöre konmuştur. Hücreler 30 dk. hipotonik eriyikte 37°C'de muamele edilmiştir. Sürenin sonunda tüpler 10 dk. 2000 rpm'de santrifüj edilmiş, süpernatant atılmıştır. Hipotonik çözelti ilavesi gibi yavaş yavaş ve karıştırarak her tüpe 5 ml olacak şekilde soğuk fiksatif ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 20 dk. fiksatif ile muamele edilen hücreler 2000 rpm'de (170 x g) 10 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra tüplere tekrar fiksatif ilave edilmiştir. Bu işlem 3 kere tekrarlanmıştır. 3. fiksatifle muamelenin sonunda tüpte kalan sıvının tamamen berraklaştığı görülmüştür. Her fiksatif ilavesinden sonra tüpler santrifüj edilerek üstteki sıvı atılmıştır. Son santrifüjden sonra dipte 0, 5 ml sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldıktan sonra yayma yapılmıştır.

Tüpün dibinde toplanan hücreler pasteur pipeti ile karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Pasteur pipetine 4-5 damla olacak şekilde bu hücre süspansiyonundan çekilmiştir. Özel olarak hazırlanmış düzeneğe tutturulan pasteur pipetinden daha önce temizlenmiş ve saf su içerisinde buzdolabında saklanan farklı alanlara 1'er damla olmak

üzere hücre süspansiyonu damlatılarak (her lama 3-4 damla) hücrelerin ve dolayısıyla kromozomların lam üzerinde yayılması sağlanmıştır. Hücre süspansiyonunun lamlara damlatılması esnasında damlaların üst üste düşmemesine dikkat edilmiştir.

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

3.5. Mikroskopik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

3.5.1. Kromozom Anomalilerinin Saptanması

Muamele edilmiş ve kontrol kültürlerde her bir kişiden hazırlanan, iyi dağılmış kromozomlara sahip preparatlardan, her bir doz için, 400 metafaz incelenerek kırık ve diğer anomaliler sayılmıştır. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı anormallikleri kromozomlara göre ayrı ayrı kaydedilmiştir. İncelenen 100 hücre içerisinde kromozom kırığı bulunan anormal hücrelerin sayısı saptanmış ve bundan da anormal hücre yüzdesi bulunmuştur.

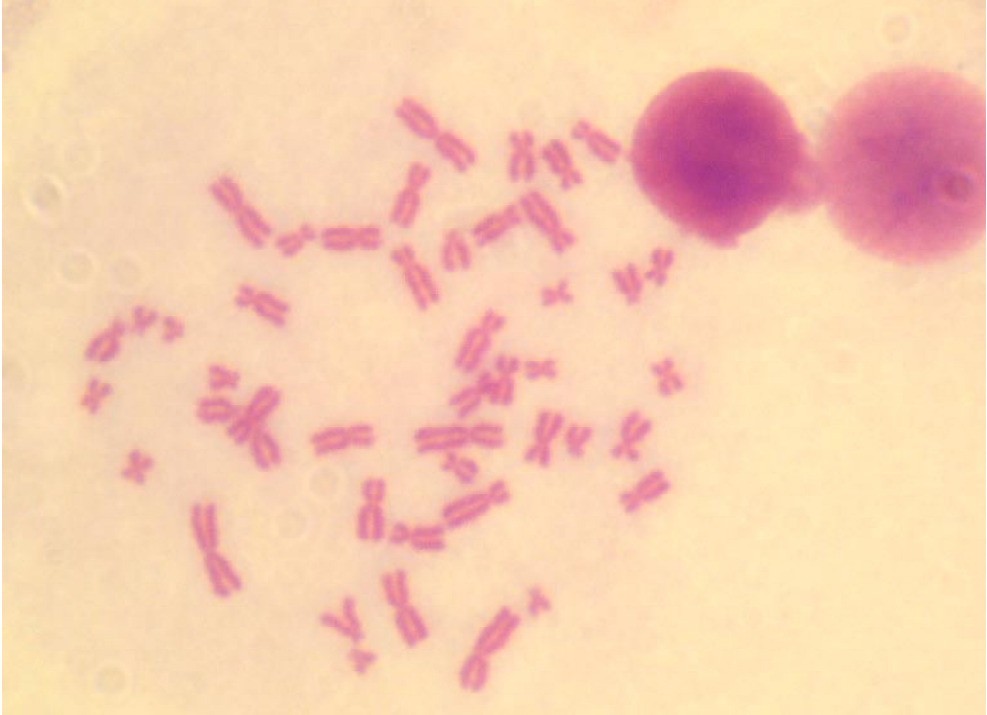
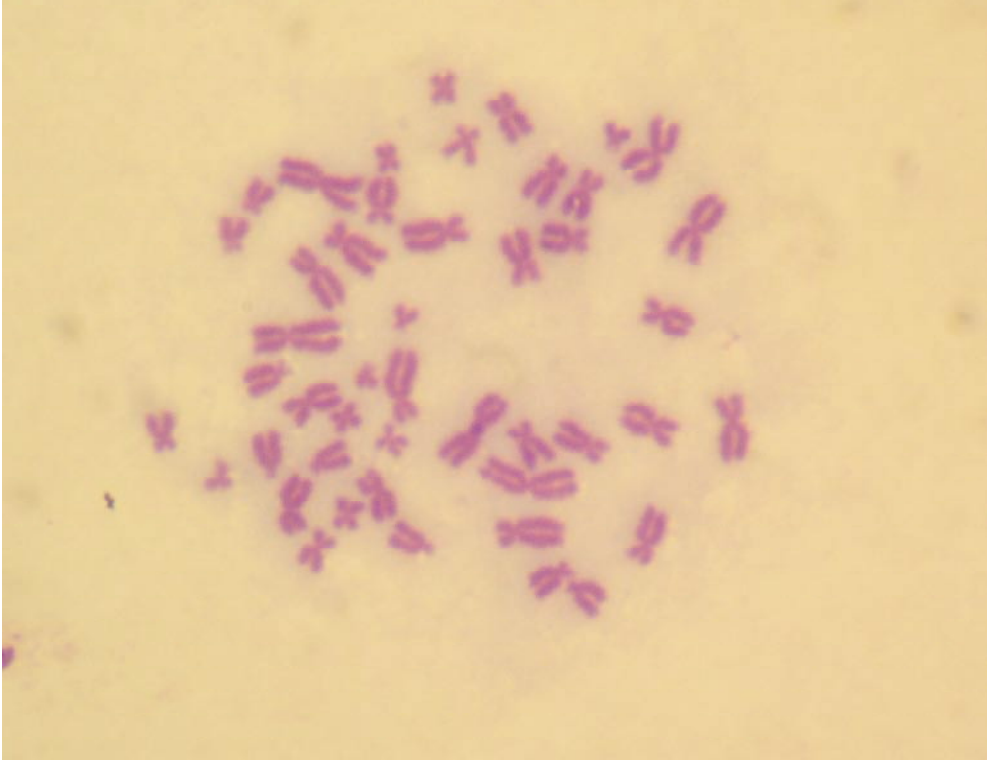
3.6. İstatistik Analiz ve Sonuçların Değerlendirilmesi

İstatistiksel analiz “GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego California USA)” programıyla yapılmıştır. Kültürde bulunan hücrelerdeki kromozom anormallikleri “*Fisher's exact test*” i ile hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

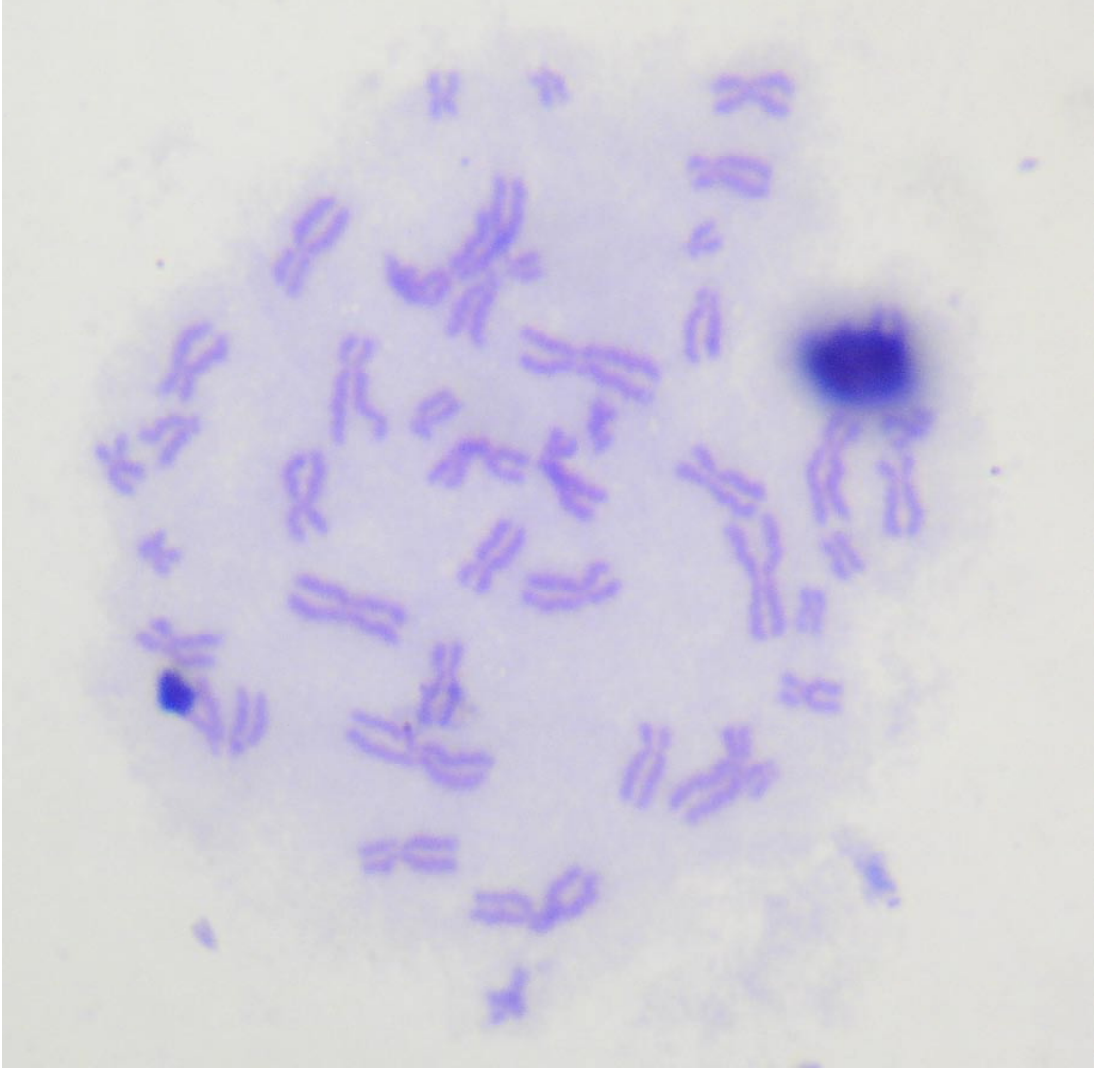
Normal insan kromozomları sağlıklı ve sigara, alkol kullanmayan üniversite öğrencilerinden tam kan olarak vena'dan alınmıştır. Şekil 1'de normal bireye ait laboratuvarımızda elde edilmiş metafazlar görülmektedir.





Şekil 1. a, b, c. Normal bir bayana ait kromozomlar.

Kromozomlar öncelikle pozitif kontrol olarak kullanılan mitomycin-c' ile etkileşime bırakılmıştır (0.3 µg/ml). Mitomycin in kromozomlarda kromozom kırıkları, kromatid kırıkları, poliploidi kromatid birleşimi gibi hasarlara neden olduğu gözlenmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. Mitomisin-c'nin insan kromozomlarına etkisi.

4.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)'in İnsan Kromozomlarına Etkisi

NaOCl besiyeri mililitresine 5 µg gelecek şekilde verilmiş ve bu dozun alt değerleri sırasıyla kullanılmıştır. (0,030-5 µg). 5 µg'lik dozda besiyerinde üremenin tamamen durduğu ve metafaz sayısının çok az olduğu gözlenmiştir. Yapılan denemeler sonrası 24 saat etkileştirme süresinin uygun olduğu daha fazla sürenin mitoz bölünmeyi engellediği saptanmıştır. 4 µg'lik dozda yine aynı baskılanma devam etmiştir. 2.5 µg'lik dozda mitozun baskılandığı ancak kromozomların bantlandığı ve çok sayıda kırığın olduğu gözlenmiştir. (Şekil 3).



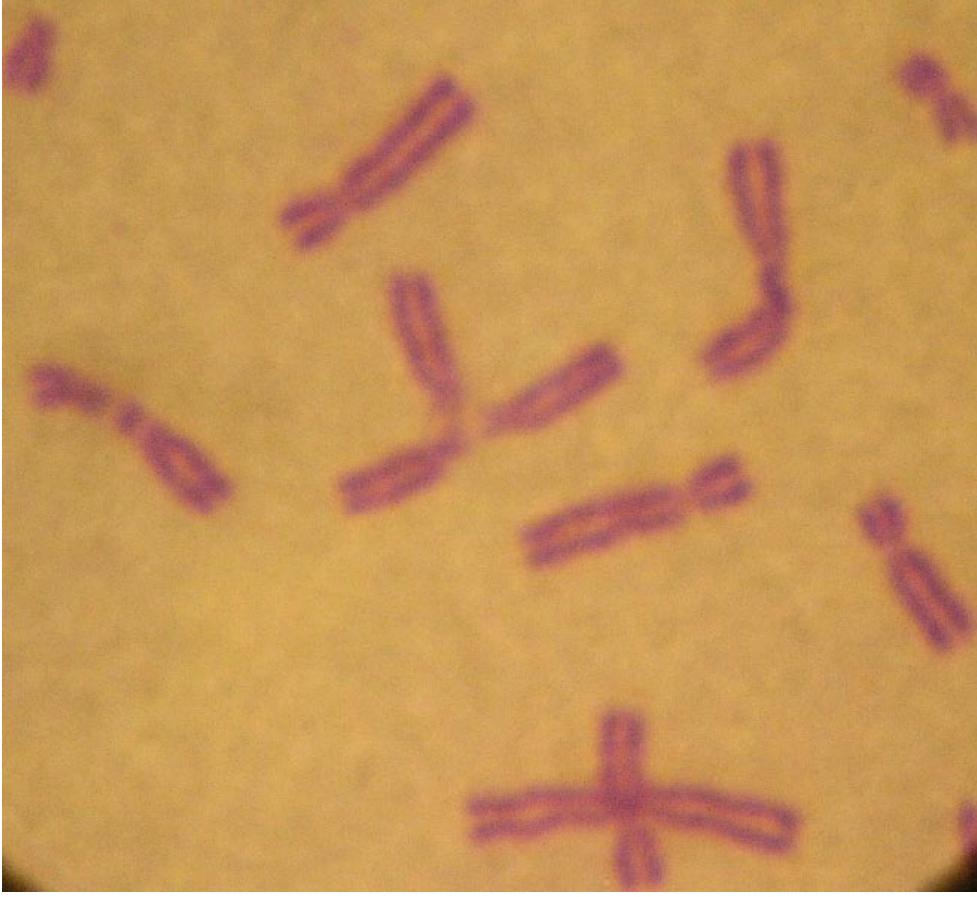
Şekil 3. 5 µg /ml'lik NaOCl dozunda mitozun baskılandığı ancak kromozomların bantlandığı ve çok sayıda kırığın olduğu gözlenmiştir.

4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik dozda yine bütün kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar vardır (şekil 4).



Şekil 4. 4 μg 'lik dozda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar.

2 μg 'lik dozda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar, birleşme bölgeleri ve 1 ve 2 nolu kromozomların kısa kolları arası birleşme vardır. (Şekil 5. a. b. c.).



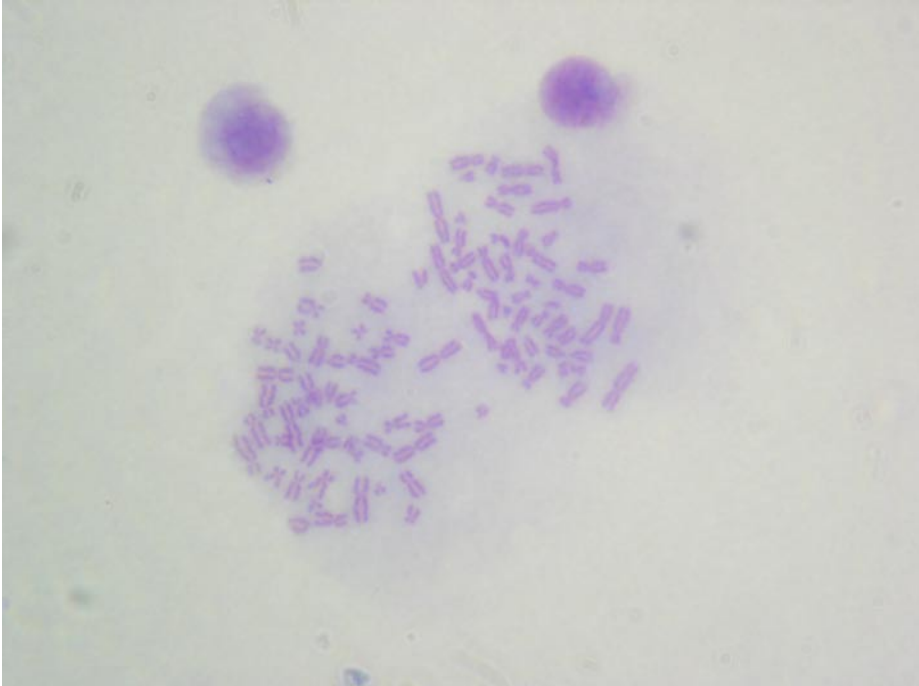
Şekil 5. 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik NaOCl dozunda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar, birleşme bölgeleri ve 1 ve 2 nolu kromozomların kısa kolları arası birleşme.

1 μg 'lik ml 'lik dozda kromozomlarda gözlene belirgin kırıklar, birleşme bölgeleri ve 1 ve 2 nolu kromozomların kısa kolları arası birleşme vardır. (şekil 6).

NaOCl'nin belirli dozlarında ve pozitif kontrolde poliploidi'ye rastlanmıştır (Şekil 7).



Şekil 6. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik dozda kromozomlarda gözlenen belirgin kırıklar.Kromatid birleşmeleri.



Şekil 7. NaOCl' nin bazı dozlarında görülen poliploid yapılara bir örnek.

Tablo 1. NaOCl' nin değişik dozları ile etkileşime sokulan insan lenfosit kültürü kromozomlarında kromozom aberasyonu sıklığı.

Test maddesi	Uygulama		Yapısal kromozom bozuklukları				Sayısal bozukluklar	Kromozom bozukluklarının sıklığı/hücre±SH(%)
	Süre (s)	Dozlar (µg/ml)	ctb	csb	scu	cu	p	
NK	24	1	1	-	-	-	-	0.2± 0.2
MMC	24	0.3	19	2	3	7	1	6.2± 3.3
NaOCl	24	0.015	1	-	-	-	-	0.2± 0.2
		0.030	7	1	1	1	1	2.2± 1.2*
		0.060	8	1	4	1	1	2.8± 1.4*
		0.100	9	1	2	-	-	2.4± 1.6*
		0.25	13	2	4	2	-	4.2± 2.7*
		0.5	15	3	1	1	1	4± 2.7*
		1	14	1	1	0	1	3.2± 2.6*
		2	15	2	2	2	2	4.2± 2.7*
4	13	2	4	2	2	4.2± 2.2*		

ctb: kromatid kırığı, csb: kromozom kırığı, cu: kromatid birleşmesi, scu: kardeş kromatid birleşmesi, nk: negatif kontrol (%1 distilled water), p: poliploidi, MMC: (0.3 µg/ml mitomycine-C (24 saat).

* p ≤ 0.05 kontrolle karşılaştırıldı. (Fisher's Exact Test)

Tablo 1' den de görülebileceği gibi doz arttıça kromozom kırığı ve diğer aberasyonların oranı artmaktadır. Poliploidi görölmesi bu maddenin hücre bölünmesi üzerine de etki ettiğinin bir belirtisidir.

5. TARTIŞMA

Su insan yaşamında tartışılmaz bir öneme sahiptir. Ayrıca derelerden ırmaklardan ve göllerden alınarak yerleşim yerlerindeki insanların kullanımına sunulan su belirli standartlara uymak zorundadır. Aksi durumda kullanılması tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir. Günümüzde teknolojinin gelişmesi, nüfus artışı gibi etkenlerden dolayı su kaynakları olan dereler, göller ve yeraltı suları aşırı kirlenme ile yüz yüze kalmaktadır. Yerleşim yerlerinin (şehir, kasaba, vs.) ve fabrikaların atık suları derelere veya göllere bağlanmaktadır. İstenilmeyen hayvan, bitki ve mikroorganizmaların öldürülmesi amacıyla kullanılan kimyasallar içme sularına kadar ulaşabilmektedir. Bu kimyasalların bir kısmı doğada etkisiz hale getirilirken bir kısmı ise uzun yıllarca etkisini sürdürmektedir [8].

Mutasyon kalıtsal bilgide oluşan kalıcı değişimlerdir. Çevresel etkenlerin mutasyona sebep olabildikleri üzerine pek çok araştırma vardır. Bu etkenler gen mutasyonuna, kromozom kırıklarına ve diğer anormalliklere sebep olabilmektedirler. İnsanda DNA sentezinde nokta mutasyonları bile önemli anomalilere sebep olabilmektedir. Ultraviyole ışınları, iyonize radyasyon, nitrozaminler, benzopiren, kromyum, hidrazin, vinil klorür ve aflatoxin'ler çevresel mutajenlere örnek olarak verilebilir. Bu etkenler, alkilasyon, arilasyon, interkalasyon, baz analogu girişi, deaminasyon, enzim inhibisyonu ve metafaz etkileyici olarak işlev görürler. Bu mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkan kanser olaylarının % 2 sini çevresel mutajenler başlatmaktadır [8].

Gelişmekte olan ülkelerde içme sularının kontaminasyonu ve yetersiz hijyen bir yılda yaklaşık 4 milyar kişide diyare ortaya çıkmasına ve bunların, çoğu beş yaş altı çocuk olmak üzere 2.2 milyonunun ölmesine sebep olmaktadır. Kontamine sular diyare'nin yanı sıra tifo, hepatit A, polio ve kolera gibi salgın hastalıkların ortaya çıkmasına da sebep olmaktadır. Bu tür su kökenli hastalıkların önüne geçebilmek için suların klorlanması yaklaşık 100 yıldır etkili olarak kullanılıyor. Çalışmalar, klorlanmış su içiminin üriner ve gastrik kanser oluşumunun yanı sıra üreme sistemi ve gelişim üzerine etkili olduğunu göstermiştir.

Yapılan birçok epidemiyolojik çalışma, klorinli içme sularının insanlarca tüketilmesi sonucu özellikle gastrointestinal ve üriner bölge kanserlerinin ortaya çıkmasındaki riski arttırdığı sonucunu desteklemektedir. Kimyasal analizler, epidemiyolojik çalışmalar ve long-term karsinogenisite testlerinin yapılmasındaki zorluklar karşısında, karsinogenik aktiviteyi önceden belirleyebilen, hızlı ve ucuz olan short-term mutajenitesi testleri uygulamaya başlandı. Birçok araştırmacı tarafından yıllardır yapılan çalışmalar dezenfekte suların neden olduğu kirliliğin deniz canlıları üzerindeki potansiyel etkilerini genotoksisite de içinde olmak üzere short-term testlerle araştırmaktadırlar. Klorinli içme sularında, salmonella/microsome (AMES) başta olmak üzere in vitro test sistemleri uygulandığında bu sularda yüksek mutajenik aktivite tespit edilmiştir. Örneğin yapılan bazı çalışmalarla hem İtalya hem de diğer yerlerde salmonella mutajenitesi gibi in vitro olan short-term testlerle içme sularındaki mutajenlerin varlığı kolayca tespit edilmiştir. Salmonella/microsome (AMES) testi ile klorine suların genotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiş, bu aktivitenin genelde klorinli dezenfektanların suda doğal olarak bulunan bazı maddelerle (humik asit ve fulvik asit gibi) etkileşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir [24,31].

Birleşik Devletler, Ulusal Toksikoloji Programı (U.S. N.T.P.). Mikroçekirdek denemelerini başka bir in vitro kısa süreli test olan Salmonella Testi (Ames Testi] ile birlikte yapılmasını ya da değerlendirilmesini önermektedir. 29 Kanserojen ve 17 kanserojen olmayan madde Salmonella denemelerinde ve fare kemik iliğinde mikro çekirdeğe yol açıp açmadığını tespit etmek için test edilmiştir. Her iki denemede pozitif tepki veren 13 kimyasal maddenin kanserojen olduğu saptanmıştır. Salmonella denemelerinde negatif sonuç veren, fakat fare kemik iliğinde test sonucu pozitif olan 8 kimyasal madde arasından 6 sınıfın kanserojen olduğu belirlenmiştir. Bu noktada “in vivo” testinin Salmonella denemesinde gözden kaçan 6 kanserojeni tanıdığı sadece 21 taneden 2 tanesinde yanlış pozitif tepki verdiği bildirilmektedir. Her iki testte de negatif sonuç veren 10 kimyasal madde arasında 4 kanserojenin olduğu tespit edilmiştir. Ancak bunlarında gerçek genotoksik olmayan kanserojen olduğu görüşü yaygındır. Uluslar arası kanser araştırmaları ajansının (I.A.R.C.) değerlendirmesinde insan için kanserojenik olmayan bir madde olarak varsayılp sınıflandırılmıştır. Bu konuda Birleşik Devletler Ulusal Toksikoloji Programı ve Uluslararası Çevre Örgütü (U.S.

N.T.P. ve E.P.A) önemli sonuçlara ulaşmıştır. Bunlardan birincisi, Salmonella Testinin tek başına genotoksinleri fark edemeyeceği yönündedir. İkincisi ise, “in vivo” bulgusundaki negatif yeterlilik ve uygunluk, pozitif “in vitro” sonuçlarına baskın değildir. Bu düşüncelerden anlaşılacağı üzere in vivo testler ve buna bağlı mikroçekirdek testi, kanserojenlerin belirlenmesinde daha çok güvenilir görünmekle birlikte, diğer kısa süreli testlerle beraber alınan sonuçlarında dikkate alınması yerinde olacaktır. Aslında mikroçekirdek testini bu derece ve bu açıdan önemli kılan: in vivo çalışmalar için doğrudan ya da metabolize edildikten sonra etki gösteren mutajenlerin, memelilerde oluşturduğu genetik zararları belirlemede çok uygun olmasındandır. Bu test mutajenlerin hücre döngüsünün özgül zamanları üzerindeki etkilerini ve kemik iliği hücrelerinin çoğalma durumları hakkında bilgi verir. Pınar AKSU ve arkadaşları inci balığı (*Achantalburnus microlepis*) üzerine çalışmışlar ve *Acanthalburnus microlepis* suyun her litresinde sodyum hipokloritin 0.05, 0.10, 0.25, 0.37, 0.50, 0.75 ve 1 mg/lt bulunan konsantrasyonlarına akvaryumda 6 gün maruz bırakmışlardır. Her bir konsantrasyonun bulunduğu denemelerde 10 balık kullanılmıştır. Etkilesime bırakılan her bir konsantrasyon düzeyinde mikronükleus oluşum frekansı saptanmıştır. Kontrol gruplarının, pozitif ve negatif grupla karşılaştırılmasıyla mikronükleus oluşum frekansının arttığını tespit etmişlerdir. Sodyum hipokloritin LC 50 değerini 0,6343 mg/lt olarak hesaplamışlardır. Sonuçlar, sodyum hipokloritin *Acanthalburnus microlepis* ' de genotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir [25].

Sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonu yaklaşık olarak %12,5-25 oranında aktif klorin gazı (Cl₂) içerir. Biosid özelliğine sahip olup evsel, endüstriyel, tıbbi ve bilimsel uygulamalarda yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Sodyum hipoklorit (NaOCl) genellikle sulu çözeltiler halinde deneylere katılır. Bazık şartlarda (pH>9.5) sulu çözeltilerde nispeten kararlıdır. Sodyum hipoklorit, nötral sulu çözeltilerde serbest HOCl'ya kolaylıkla hidrolize olur. Zayıf asidik şartlarda Cl₂ açığa çıkar. Hipokloröz asit için plazma yarı ömrü süttten kesilmemiş hayvanlarda 89 saat süttten kesilmiş hayvanlarda 44 saattir. Cl⁻ iyonları plazmada bulunabilen tek metabolittir; klorit ve klorat iyonları tespit edilmemiştir. Ağızdan alındıktan sonra dokularda herhangi bir depolanmaya rastlanmamıştır. Hali hazırdaki veriler NaOCl'ın düşük akut oral toksisiteye sahip olduğunu göstermektedir (Fare'de oral LD₅₀ değeri 5800–6800 mg/kg). toksisite işaretleri düşük genel aktiviteyi, hipotermiyayı, diareyi, hemolizi, pilo-

ereksiyonu ve mukoz membran irritasyon ve yanıkları içerir. Sulu NaOCI çözeltileri ciddi şekilde irritasyona veya cilt ve gözlerde tahrişe sebep olur. 4 saatlik tek bir uygulama için üst deriyi tahriş eden en düşük derişim %2 dir. Tavşan gözlerinde bir tahribat etkisi oluşturabilmesi için bu değerin % 0.5 ten küçük olması yeterlidir. İçme sularındaki alt kronik dozaj (30–190 mg/kg NaOCI) farelerdeki değışimlerin tedavisinde etkin değildir (Yüksek dozajlardaki vücut ağırlığı kazanımının inhibisyonu hariç). NaOCI'nin mümkün mutajenik aktivitesi ile ilgili birçok literatüre rastlamak mümkündür.

Sularda gelişen toksik maddeler endüstriyel, tarımsal ve kentsel atıkların yanı sıra suların dezenfekte edilmesinden de kaynaklanmaktadır [26]. Özellikle sanayi tesislerinde fouling önleyici olarak kullanımı sulara direkt verilmesi açısından önemlidir. Su ihtiyaçlarını temin etmek amacıyla deniz kıyısında kurulan sanayi tesislerinin su giriş ve çıkış boruları, zamanla fouling oluşturan çeşitli organizmalar tarafından tıkanmakta ve su akışı engellenmektedir. Bu olayı önlemek için genellikle kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla çoğunlukla ucuz, etkili ve uygulama kolaylığı bakımından klor tercih edilmektedir. Klor uygulaması kesikli olarak şoklama şeklinde yapılabildiği gibi ortama devamlı klor verilmesi şeklinde sürekli sistemlerle yapılabilmektedir. Yapılan bir araştırmaya göre sürekli sistem uygulandığı zaman makro fouling organizma kontrolünü daha etkili bir şekilde yapıldığı bildirilmektedir. Özellikle demir- çelik endüstrisi termik santraller ve nükleer santraller gibi yoğun soğutma suyu kullanan tesislerde bu sorunun bertaraf edilebilmesi için anti fouling kimyasallar kullanılmakta ve yaygın olarak hipoklorit bileşikleri tercih edilmektedir [13,14]. Yapılan bir araştırmada foulinge neden olan *Pinctada radiata* adı verilen inci istiridyesinde, klor kaynağı olarak sodyum hipokloritin kullanıldığı 24 saatlik öldürücü klor konsantrasyonları LC₅₀ için 1.75 mg^l⁻¹, LC₉₀ için 5,36 mg^l⁻¹, LC₉₅ için 7,58 mg^l⁻¹ olarak bulunmuştur [31].

Su kaynaklı hastalıklara ve bununla beraber ölümlere sebep olan etmenlerin ortadan kaldırılması için uzun bir süreden beri içme suları klorinizasyona tabi tutulmaktadır. Bu muamele sonucu suda yaşayan patojenlerin mortalitesinde oldukça iyi sonuçlar vermiştir. Ancak 2004 yılında Monarca, klorinlenmiş olan bu içme sularında bazı karsinojenik ürünlerin (kloroform ve trihalometanlar gibi) bulunduğunu buldu. Ayrıca, kullanılan kimyasal dezenfektanların ve bunların parçalanması sonucu oluşan toksik

ürünlerinin sucul ortamda yaşayan organizmalarda birçok yan etkilere yol açtığı anlaşılmıştır [28].

Uzun yaptığı çalışmada Sodyum hipoklorite maruz kalmıs ve sağlıklı kontrol kisilerden periferal kan örnekleri alınıp kültüre etmiştir. Kültürlere sitokinezi durdurmak amacıyla 44. saatte 3µg/ml son konsantrasyonda sitokalazin B (Cyt-B) eklenmiş ve 72. Saatte kültürler sonlandırmıştır [26].

Sodyum hipoklorite maruz kalmıs kisilerin kültüre edilmiş lenfositlerindeki MN degerlerini 1.70 ± 0.33 (ortalama \pm SS) ve kontrol kisilerin MN degerlerini 0.75 ± 0.27 olarak bulmuştur. Kontrol kişilerle karşılaştırıldığında sodyum hipoklorite maruz kalmıs kişilerin MN degerlerinin istatistiksel olarak kontrollerin MN degerlerinden daha yüksek olduğunu bulmuştur. Sonuçta sodyum hipoklorite maruz kalmıs insanlarda genotoksik etkinin ortaya çıktığını göstermişlerdir [26].

Monarca ve arkadaşları [28] içme suyunu 2-4 mg /lt NaOCl ile mumamele ederek bakteri öldürücü dozlarını buldular. Çalışmamız sonucunda bu dozların çok altındaki dozlarda bile (0,125 mikrogram/ml) NaOCl'nin kromozomlarda mutasyona sebep olduğu belirlenmiştir (Şekil 2,3,4,5,6).

6. KAYNAKLAR

1. Wolkoff P, Schneider KJ, Degerth R, Jaroszewski M, Schunk H., Risk in cleaning: Chemical and physical exposure. *The Science of Total Environment*, 215:135-56 (1998).
2. Ulupınar, M., Alaş, A., "Balık Sitogenetiği ve Laboratuar Teknikleri Kitabı" I Baskı, s. 10 (2002).
3. Özyurt, M., Klimik Dergisi. Cilt 13, Özel Sayı., s: 41–48 (2000).
4. Rutala WA, Weber DJ., Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin Microbiol Rev*, 10(4): 597-610 (1997).
5. Winder C., The toxicology of chlorine. *Environ Res*, 85 (2): 105-114 (2001).
6. Medina-Ramon M, Zock JP, Kogevinas M, et al., Asthma, chronic bronchitis, and exposure to irritant agents in occupational domestic cleaning: A nested case-control study. *Occup Environ Med*, 62: 598-606 (2005).
7. Wolkoff P, Schneider T, Kildeso J, Degerth R, Jaroszewski M, Schunk H., Risk in cleaning: Chemical and physical exposure. *Sci Total Environ*, 215: 135-156 (1998).
8. Yu, M-H., Environmental Toxicology, Lewis Publisher, New York, 209-230 (2001).
9. Dartar-Öztan M, Akman AA, Zaimoglu L, Bilgic S., Corrosion rates of stainless-steel files in different irrigating solutions. *Int Endod J*, 35: 655-659 (2002).
10. Penna TC, Mazzola PG, Martins AM., The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. *BMC Infect Dis.* 1: 16 (2001).
11. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS (Ed)., Disinfection, Sterilization and Preservation. SS Block. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, pp. 131-151 (1991).
12. Bloomfield SF. Chlorine and iodine formulations. In: Ascenzi JM (Ed)., Handbook of Disinfections and Antiseptics. New York: Marcel Dekker Inc, pp. 133-158 (1996).
13. World Health Organization (WHO)., Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality, Geneva, Switzerland (1996).
14. Boorman GA, Dellarco V, Dunnik JK, Chapin RE, Huntr S, Hauchman F, Gardner H, Cox M, Sills RC., Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation. *Environ Health Perspect* 107 (1): 207–217(1999).
15. Soffritti M, Belpoggi F, Lenzi A, Maltoni C., Results of long term carcinogenicity studies of chlorine in rats. *Ann. NY Acad. Sci*, 26: 189–208 (1997).

16. Koivusalo M, Pukkala E, Vartiainen T, Jaakkola JJ, Hakulinen T., Drinking water chlorination and cancer—a historical cohort study in Finland. *Cancer Causes Control*, 8: 192–200 (1997).
17. Steffensen IL, Paulsen JE, Engeset D, Kronberg L, Alexander J., The drinking water chlorination by-products 3,4-dichloro-5-hydroxy-2[5H]-furanone (mucochloric acid) and 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone do not induce preneoplastic or neoplastic intestinal lesions in F344 rats, Balb/ca mice or C57bl/6J-min mice. *Pharmacol. Toxicol*, 85: 56–64 (1999).
18. Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, et al., 2007. Perturbation of cytochrome P450, generation of oxidative stress and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed *in situ* to potable surface water. *Mutat Res*, 626: 143-154.
19. Buschini A, Martino A, Gustavino B, Monfrinotti M, Poli P, Rossi C, Santoro M, Dörr AJM, Rizzoni M., Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed *in situ* to lakewaters treated with disinfectants for potabilization. *Mutat Res* ,557: 119–129 (2004).
20. Maffei F, Buschini A, Rossi C, Poli P, Forti GC, Hrelia P., Use of the Comet test and Micronucleus assay on human white blood cells for *in vitro* assessment of genotoxicity induced by different drinking water disinfection protocols. *Environ Mol Mutagen*, 46(2): 116-125 (2005).
21. Hamaguchi F, Tsutsui T., Assessment of genotoxicity of dental antiseptics: ability of phenol, guaiacol, p-phenolsulfonic acid, sodium hypochlorite, p-chlorophenol, m-cresol or formaldehyde to induce unsheduled DNA synthesis in cultured syrian hamster embryo cells. *Jpn J Pharmacol*, 83: 273-276 (2000).
22. Miyachi T, Tsutsui T., Ability of 13 chemical agents used in dental practice to induce sister chromatid exchanges in Syrian hamster embryo cells. *Odontology* 93: 24-29 (2005).
23. Hagiwara M, Watanabe E, Barrett JC, Tsutsui T. Assessment of genotoxicity of 14 chemical agents used in dental practice: Ability to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res*, 603(2):111-20 (2006).
24. Gül S, Özkan O, Nur G, Aksu P., Genotoxic Effects and LC₅₀ Value of NaOCl on *Orthrias angorae* (Steindachner, 1897). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 80 (6) 544-548 (2008).
25. Aksu, P., Gül, S., Özkan, O., Nur, G., Kaya, Ö.T., Evaluation of the Acute Toxicity and genotoxicity of NaOCl on *Acanthalburnus microlepis* (De-Filippi 1863) *Fresenius Environmental Bulletin*, 17:3, 298-302 (2008).
26. Uzun, S. Sodyum Hipoklorite Maruz Kalmış Kişilerin Lenfositlerindeki Mikronükleus Sıklığının Araştırılması. (Yüksek Lisans Tezi), *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı*, Kayseri, (2007).

27. Fimognari, C., Nusse, M., Cesari, R., Cantenelli-Forti, G., Hrelia, P., Micronuclei induction, cell cycle delay and apoptosis as markers of cellular stress caused by ursodeoxycholic acid in human lymphocytes. *Mutat Res*, 495(1-2):1-9 (2001).
28. Monarca, S., Zani, C., Susan, D., Richardson, D., Thruston, Jr., Massimo, M., Donatella, F., Milena, V., A new approach to evaluating the toxicity and genotoxicity of disinfected drinking water, *Water Research*, 38, 3809–3819 (2004).
29. Budak Diler, S. Ethil metansulfonat (EMS) ve mitomisin C (MMC)'ye insan kromozomlarının hassasiyeti. (Doktora Tezi), *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Adana, (2006).
30. Rencüzoğulları, E. and Topaktaş, M., 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 (1991).
31. Göksu MZL, Çevik F, Fıfık Ö., İnci istiridyesi *Pinctada radiata* (Leach, 1814) için öldürücü Klor konsantrasyonları. *Turk J Vet Anim Sci*, 26: 57–160 (2002).

7. ÖZ GEÇMİŞ

Asu SAVSAR; 1977 Yılında İçel-Mersin de doğdu. İlk,orta ve lise öğretimini Mersin’ de tamamladı. Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi Bölümü’nden 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mersin’de göreve başladı. Tepeköy İlköğretim Okulu’nda bir yıl, Çavak Günferi Karagenç İlköğretim Okulu’nda üç yıl sınıf öğretmeni olarak görev yaptıktan sonra, 2004 yılında Kars’a tayin oldu. Dağpınar P.İ.O’nda bir yıl, Kazım Karabekir Paşa İlköğretim Okulu’nda bir yıl, Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu’nda bir yıl görev yaptıktan sonra 2007 yılında asıl branşı olan Biyoloji bölümüne geçiş yaptı. 2007 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Zooloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisansa başladı. Şu an Cumhuriyet Lisesinde Biyoloji öğretmeni olarak görev yapıyor ve yüksek lisansa devam ediyor.

