



Erciyes University Journal of the Institute of Science and Technology
Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi
 ISSN 1012-2354

Cilt (Volume) 27, Sayı (Issue) 2, Nisan/April-2011
<http://fbe.erciyes.edu.tr/>



Kimya öğrencilerinde, kimyasalların genotoksik etkisinin kromozom aberasyon testiyle belirlenmesi

Bilge EROL¹, *Songül BUDAK DİLER²

¹Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, NİĞDE

²Niğde Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, NİĞDE

Anahtar Kelimeler

Kimyasal madde,
genotoksik etki,
lenfosit kültürü,
kromozom
aberasyonu.

ÖZET

Üniversitelerin kimya bölümünde okuyan öğrenciler, laboratuvar çalışmaları esnasında çeşitli kimyasallara maruz kalırlar. Bu kimyasalların öğrencilerde genotoksik risk oluşturup oluşturmadığı, in vitro lenfosit kültüründe, kromozom aberasyonu (KA) testiyle belirlendi. Bu çalışmada, Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğrencileri ile kimyasala maruz kalmayan öğrencilerden periferik kan örnekleri alındı. Deney ve kontrol grubundan elde edilen preparatların incelenmesi ile kromozom anormallikleri ve mitotik indeks belirlendi. Bu iki gruptan elde edilen veriler, t-testi ile karşılaştırıldı ve laboratuvar çalışmalarının öğrencilerde kromozom anormalliklerini kontrole göre arttırmadığı ve mitotik indeksi de önemli derecede değiştirmedeği saptandı (p>0.05).

Determination of chemically induced genotoxicity by chromosomal aberration test in chemistry students

ABSTRACT

Keywords

Chemical
substance,
genotoxic effect,
lymphocyte
culture,
chromosomal
aberration.

University students studying chemistry at degree level are exposed to various chemicals during their laboratory works. To determine if this exposure constitutes a genotoxic risk factor, lymphocytes from exposed subjects were examined in vitro by employing the chromosomal aberration (CA) test. Peripheral blood samples were taken from the subjects who were students at the Chemistry Division of the Faculty of Literature and Sciences, University of Niğde. Controls consisted of unexposed students. Chromosomal anomalies and mitotic index of peripheral blood cells from all subjects were determined. The results from the two groups were compared by the t-test. There were no significant differences between the two groups in terms of CA and mitotic index (p>0.05).

1. Giriş

Günümüzde gelişen dünyada her geçen gün kimyasal madde miktarı ve kullanımı artmaktadır. Kimyasal maddelerin insanda neden olduğu mutajenezisi, kantitatif olarak değerlendirmek çok güçtür. İnsanların mutajenlere maruz kalması ile etkileri arasında uzun bir süre vardır. Çevrede bulunan ve mesleki olarak maruz kalınan birçok kimyasal maddenin mutajenik potansiyele sahip olduğu, hayvan ve bakteri testleri ile gösterilmiştir [1-5]. Kimyasal maddelerin endüstrideki kullanımının insanda oluşturduğu genotoksik etkiler, genetik toksikolojide kullanılan tarama testleri ile araştırılabilmektedir. Bu testler, kromozom düzeyinde kromozom aberasyonu testi (KA), mikronukleus testi (MN) ve kardeş kromatid değişimi testi (KKD) ile gen düzeyinde ames testi ve moleküler düzeyde tek hücre jel elektroforez testidir (COMET Assay) [1]. Kimyasal maddelerin insanlar üzerindeki mesleki maruziyetini belirlemek için maden işçileri ile boya sanayisinde çalışan işçilerde kromozom aberasyon testi yapılmış ve maruz kalma süresine bağlı olarak bu işçilerde kontrole göre kromozom aberasyonlarının arttığı belirlenmiştir [6,7]. Pestisit endüstrisinde çalışan ve yoğun bir şekilde pestisit karışımına (atrozine, alakloaranazin, 2,4-diklorofenol asetik asit ve malation) maruz kalan tarım işçilerinde, KA ile KKD miktarının arttığı ve MN sıklığının çok yüksek olduğu bulunmuştur [8]. Aynı şekilde kimyasallara en çok maruz kalan araba tamircileri, trafik polisleri, petrol istasyonunda çalışan işçiler ve taksicilerden bukkal epitel hücresi alınarak, MN testi yapılmış ve işçilerde MN düzeyinin kontrole göre yüksek olduğu tespit edilmiştir [9-11]. Gübre (fosfat) fabrikasında çalışan işçilerin lenfosit hücrelerinde KA ile MN testi yapılmış ve araştırma sonucunda 10 yıldan fazla çalışan işçilerde, maruz kalmaya bağlı olarak KA ve MN'nin arttığı gözlenmiştir [12]. Ayrıca polisiklik aromatik hidrokarbonlarla (PAH) yapılan çalışmalarda, bu maddelerin insan ve hayvanlarda kanseri indüklediği belirlenmiştir [13].

Kimyasal maddelerin insan üzerindeki etkilerini değerlendirirken, çevrede doğal olarak oluşan fiziksel ve kimyasal mutajenleri de değerlendirmek gerekir [1]. Fiziksel mutajenlerden olan güneş ışığı en önemli radyasyon kaynağıdır. Yapılan bir çalışmada, insan sperm hücreleri radyasyona tabi tutulmuş ve radyasyon alan sperm hücrelerinde kromozom aberasyonunu arttırdığı rapor edilmiştir [14]. Aynı şekilde ozona maruz kalan sağlıklı genç bireylerin bukkal epitel ve periferik lenfositlerindeki sitogenetik hasarlar toplam 126 üniversite öğrencisinde incelenmiş ve O₃ miktarı yüksek bölgede bulunan öğrencilerdeki MN miktarının her iki hücre tipinde de arttığı, özellikle de bukkal epitel hücrelerinde bu artışın %39 oranında gerçekleştiği bildirilmiştir [15]. Bazı kimyasal maddelerin (etilen oksid, etanol, nitric oksid, v.b) genotoksik etkileri araştırılmış ve risk taşıyıp taşımadıklarına dair bilgiler rapor edilmiştir [16-22]. Bu maddelerden özellikle etilen oksidin genotoksik olduğu [16], n-hekzan ve formaldehid gibi organik çözücülerin de, bukkal epitel hücrelerinde hasarlar oluşturduğu bildirilmiştir [23].

Yapılan birçok çalışmada, pek çok kimyasal maddenin insanlar üzerinde genotoksik risk oluşturduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada da, Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde okuyan öğrencilerin maruz kaldıkları kimyasal maddelerin periferik kan lenfosit hücrelerinde genotoksik etki oluşturup oluşturmadığının kromozom aberasyonu testi ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal Metot

Deney ve Kontrol Gruplarının Belirlenmesi

Bu çalışmada Niğde Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünde öğrenim gören ve yaşları 21-27 arasında değişen (yaş ortalaması±S.H; 24.64±0.33) 25 öğrenci deney grubu olarak, sözel bölümlerde öğrenim gören ve yaşları 21-28 arasında değişen (yaş ortalaması±S.H; 25.32±0.34) 25 öğrenci de kontrol grubu olarak belirlendi. Bu şekilde belirlenen toplam 50 kişiden, etik kurulu raporu doğrultusunda, heparinize edilmiş steril enjektörle periferik kan örnekleri alındı.

Deney grubu öğrencileri, birinci sınıfta, genel kimya (haftada 4 saat) laboratuvarında daha çok seyreltik anorganik bazlı kimyasallarla, ikinci sınıfta, analitik (haftada 4 saat) ve anorganik kimya (haftada 3 saat) laboratuvarlarında derişik organik ve anorganik kimyasallarla yapılan deneylere katılmışlardı. Üçüncü sınıfta, organik kimya (haftada 4 saat) ve fiziko kimya (haftada 3 saat) laboratuvarlarında genellikle organik kimyasallar, dördüncü sınıfta, biyokimya (haftada 3 saat) ve endüstriyel kimya (haftada 4 saat) laboratuvarlarında, derişik organik ve anorganik kimyasallara temas edilmesi ve solunması şeklinde maruz kalmışlardır. Öğrenciler deneyler esnasında koruyucu maske, gözlük, eldiven, vs. kullanmayıp, laboratuvarlar doğal yollarla havalandırılmaktadır.

Lenfosit Kültürünün Yapılması ve Preparatların Hazırlanması

Kişilerden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilen periferik kan örnekleri, kromozom medyumlarına steril şartlarda ekilerek, inkübatörde 37 °C'de 72 saat inkübe edildi. Kültür süresinin 70. saatinde, her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden 35 µl (0.06 µg kolşisin/ml) ilave edildi ve 72.saate kültür tüpleri etüvden alınarak, 1200 rpm'de (170 x g) 15 dak. santrifüj edildi. Sonra süpernatant atıldı ve her tüpe 5 ml hipotonik eriyik ilave edilerek, 37 °C'de, 15 dak. bekletildi. Daha sonra 1200 rpm'de santrifüj yapılarak, tekrar süpernatant atıldı ve her tüpe 5 ml soğuk fiksatif eklenerek, oda sıcaklığında 20 dak. fiksatif ile muamele edildi. Muamele sonunda tüpler, 1200 rpm'de 15 dak. santrifüj edilerek, süpernatant atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. Son santrifüjde, dipte kalan 0.5-0.7 ml sıvıdan preparatlar yapıldı. Bu şekilde hazırlanan preparatlar kurutularak, %5'lik Giemsa eriyiği ile boyandı. Boyalı preparatlar entellan ile kapatılarak, mikroskopik incelemeler yapıldı.

Kromozom Aberasyonu (KA) Değerlendirmesi

Deney ve kontrol grubu öğrencilerdeki kromozom yapı ve sayı anormalliklerini (KA)'yı, belirlemek için her kişiden hazırlanan, iyi dağılmış kromozomlara sahip 100 hücre (25'i deney grubu, 25'i kontrol grubu olmak üzere toplam 50 kişiden 5000 hücre) incelendi. İnceleme sırasında, bu hücrelerde gözlenen kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, kromatid değişimi, disentrik kromozom, kardeş kromatid birleşmesi, halka kromozom gibi yapısal (kromozom tipi ve kromatid tipi anormallikler) ve sayısal kromozom anormallikleri Paz-y-Miño ve ark.'na göre kaydedildi [24]. Saptanmış olan kromozom aberasyonlarından hücre başına düşen yapısal kromozom anormalliği yüzdesi hesaplandı. Gap'lar anormallik olarak değerlendirilmedi. Gap'lar ile kromatid ve kromozom tipi kırıklar arasındaki farklar, Kauderer ve ark.'nın bildirdiğine göre Preston'a uygun olarak ayırt edildi [25].

Mitotik İndeks (Mİ) Değerlendirmesi

Mİ hesaplamak için her kişiden 3 bin hücre incelendi ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilerek, 3 bin hücre içinde mitoz bölünme geçiren hücrelerin oranı yüzde (%) cinsinden hesaplandı.

İstatistiksel Değerlendirme

Mikroskobik inceleme sonucunda deney ve kontrol gruplarından elde edilen KA ve Mİ değerleri arasındaki farkın önemli olup olmadığı, SPSS 10.0 programındaki t-testi metodu kullanılarak karşılaştırıldı.

3. Bulgular

Kimya bölümünde laboratuvar derslerine katılıp, kimyasala maruz kaldığı düşünülen kişilerin, periferik lenfositlerindeki kromozom anormallikleri, kontrol grubu kişilerinden elde edilen hücrelerdeki kromozom anormallikleri ile karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel karşılaştırmada, iki grup arasında yapısal kromozom anormallikleri bakımından önemli bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 1). İncelenen anormal hücre yüzdesinin kontrole nazaran önemli derecede yüksek olmadığı saptandı (Tablo 1). Ayrıca yapılan incelemelerde sayısal kromozomal anormalliğine rastlanmadı.

Tablo 1. Deney grubu ile kontrol grubunun periferik lenfosit hücrelerinden elde edilen ortalama yapısal kromozomal anormallik (KA) değerlerinin istatistiksel karşılaştırması.

Grup	N	Yapısal KA /Hücre (%) Ortalama±SH	p
Kontrol grubu	25	0.033±0.002	0.731
Deney Grubu	25	0.035±0.003	

SH: Standart hata, N: Birey sayısı, $p>0.05$

Mitoz bölünmede değişiklik olup olmadığını saptamak için deney ve kontrol gruplarında Mitotik indeks (Mİ) değerleri belirlendi. Yapılan istatistiksel karşılaştırma sonucunda,

deney grubu Mİ değerleri ile kontrol grubu Mİ değerleri arasında önemli bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2. Deney grubu ile kontrol grubundan elde edilen ortalama % Mitotik İndeks (Mİ) değerlerinin istatistiksel karşılaştırması.

Gruplar	N	Mİ (%) Ortalama±SH	p
Kontrol grubu	25	5.48±0.126	0.926
Deney grubu	25	5.50±0.182	

SH: Standart hata, N: Birey sayısı, $p>0.05$

4. Tartışma ve sonuç

Kimyasal maddelerin canlılar üzerindeki zararlı etkilerinin incelenmesi için çeşitli testlerden yararlanılmaktadır. Genotoksik hasarın belirlenmesinde, kromozom aberasyonu (KA), mikronükleus (MN), kardeş kromatid değişimi (KKD), AMES ve COMET oluşumu gibi sitogenetik testler kullanılır [1]. Önceki çalışmalarda, bu testlerle çeşitli kimyasalların genotoksik etkileri araştırılmış, fakat üniversitelerin kimya bölümünde okuyan ve laboratuvar çalışmaları esnasında kimyasala maruz kaldığı düşünülen öğrencilerin, maruz kalınan kimyasallardan etkilenip etkilenmediklerine dair her hangi bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Biz bu çalışmamızda, kimya öğrencilerinin, deneyler esnasında maruz kaldıkları kimyasallardan etkilenip etkilenmediklerini, kromozom aberasyonu testi ile belirleyerek, mitotik indeksi saptadık. Laboratuvarlarda kullanılan, asitler (Asetik asit, hidroklorik asit, sülfürik asit, sitrik asit, H₂S) ve organik çözücülerle (Metanol, etanol, aseton, n-hekzan, dietil eter, kloroform, v.b) ilgili çeşitli çalışmalar yapılmış ve bu maddelerin canlılar üzerindeki genotoksik etkileri değerlendirilmiştir [16-22]. Bu kimyasal maddeler, tarım, gıda, boya sanayi ve kozmetiklerde kullanılan ilaçların etken maddesini oluşturarak, doğal çevre ve insan sağlığını tehdit etmektedir [26-29]. Kimya ve biyoloji laboratuvarında görev yapan kişilerle yapılan çalışmada, bu kişilerin çalıştıkları laboratuvarlarda maruz kaldıkları kimyasal ve biyolojik zararlardan kişisel olarak etkilendikleri, kromozom aberasyonu testi ile belirlenmiştir [30]. Bu çalışmada özellikle genetik laboratuvarında çalışan bireylerde genotoksik etkinin yüksek çıkmasının sebebi, görüntüleme sistemleri (elektron mikroskobu gibi) ve kimyasal maddelerle (hidroklorik asit, metanol, asetik asit, formaldehit, etidiyum bromid vb.) yoğun olarak çalışılmalarıdır [30]. Aynı çalışmada kimya laboratuvarı çalışanlarında kimyasal maddelerin etkisinin az olmasının sebebi ise, kimya laboratuvarlarının fiziki şartlarının iyi olması ve çalışan kişilerin eldiven, gözlük, maske vb. gibi koruyucu malzemeler kullanmaya özen göstermeleridir [30]. Benzer şekilde, ayakkabı imalathane ve tamirhaneleri ile patoloji ve anatomi laboratuvarında çalışanlarla yapılan çalışmada, bu kişilerin özellikle n-hekzan ve formaldehid gibi organik çözücülere maruz kalmaları nedeniyle bukkal epitelyum hücrelerindeki hasarların kontrol grubuna göre artış gösterdiği belirlenmiştir [23]. Biz de çalışmamızda,

kimya bölümünde öğrenim gören ve öğrenimleri süresince kimya laboratuvarlarında deney yapan öğrencilerin, bu laboratuvarlarda kullanılan kimyasal maddelerden etkilenmediklerini kromozom aberasyonu testi ile belirledik. Yaptığımız bu çalışmaya göre öğrencilerin kimyasallardan etkilenmemelerinin en önemli sebebi, kimyasallara maruz kalma sürelerinin az olması ve maruz kalınan sürenin zamana yayılmasıdır. Ayrıca, öğrencilerin kimyasal maddelerle temasının azaltılması, deneyler esnasında laboratuvarların iyi havalandırılması, çeker ocak kullanılması gibi tedbirlerin alınması da önemlidir. Daha önce de ifade edildiği gibi, çalışma koşulları, çalışılan yerin fiziki özellikleri ve maruz kalınma süresi, maruziyetten etkilenme derecesini önemli ölçüde değiştirmektedir. Öğrencilerimizin kimyasal tehditlerden en az etkilenmeleri için gerekli tedbirlerin alındığına ve gelecekte de alınacağına inanıyoruz. Bu çalışma kimya laboratuvar dersine katılan öğrenciler üzerinde yapılan ilk deneysel çalışma olması ve gelecekte yapılacak çalışmalara kaynak oluşturması bakımından önemlidir.

Kaynaklar

1. Vural, N., Toksikoloji. Pestisitler, Ankara üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73 sayfa: 344, Ankara 2005.
2. Hynes, G.M., Torous, D.K., Tometsko, C.R., Burlinson, B. and Gatehouse, D.G. The single laser flow cytometric micronucleus test: a time course study using colchicine and urethane in rat and mouse peripheral blood and acetaldehyde in rat peripheral blood. *Mutagenesis*. 17(1), 15-23, 2002.
3. Derelanko, M.J., Rinehart, W.E., Dean, E. and Rodwell, D.E. Developmental toxicity studies of methyl ethyl ketoxime (MEKO) in rats and rabbits. *Drug Chem Toxicol*. 26 (3), 147-68, 2003.
4. Boyacıoğlu, M. ve Parlak, H. İzmir Körfezine Akan Dere Sedimentlerinin Mutajenitesi E.U. *Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*. 18 (3-4), 325 –331, 2001.
5. Mercangöz, A. ve Ayaz Tüylü B. 2, 4, 5 Tri (Süstitü) Fenil İmidazol ve Türevlerinin Mutajenik Etkilerinin Ames/Salmonella Test Sisteminde Saptanması. *Türk J Biol*. 24, 57–64, 2000.
6. Madhavi D., Devi, K.R. and Sowjanya BL. Increased frequency of chromosomal aberrations in industrial painters exposed to lead-based paints. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 27(1), 53-9, 2008.
7. Santa Maria, S.,R., Arana, M., and Ramirez, O. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes from male native miners working in the Peruvian Andes. *Genet. Mol. Biol*. 30(4), 1415-4757, 2007.
8. Hoyos,L.S., Carvajal, S., Solano, L., Rodriguez, J., Orozco, L., Lopez, Y. and Au, W.W. Cytogenic monitoring of farmers exposed to pesticides in Colombia. *Environ. Health Perspect*. 104(3), 535–538, 1996.
9. Çelik, A., Çavaş, T., and Ergene Gözükara, S. Cytogenetic biomonitoring in Petrol sation Attendants: Micronucleus Test in exfoliated buccal cells. *Mutagenesis*18(5), 417-421, 2003.
10. Besaratinia, A., Van Straaten, H.W., Godschalk, R.W., Van Zandwijk, N., Balm, A.J, Kleinjans, J.C. and Van Schooten, F.J. Immunoperoxidase detection of polycyclicaromatic hydrocarbon-DNA adducts in mouth floor and buccal mucosa cells of smokers and nonsmokers. *Environ Mol Mutagen*. 36(2), 127-33, 2000.
11. Martino-Roth, M.G., Viegas, J. and Roth, D.M. Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genet Mol. Res*. 2(4), 410-417, 2003.
12. Meng, Z. and Zhang, B. Chromosomal Aberrations and Micronuclei in Lymphocytes of Workers at a Phosphate Fertilizer Factory. *Mutation Research*. 393, 283-288, 1997.
13. Karahalil, B., Karakaya, A.E. and Burgaz, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis. Mut. res., Genet. toxicol. environ. Mutagen*. 442, 29-35, 1999.
14. Kamiguchi, Y. and Tateno, H. Radition and Chemical Induced Structural Chromosome Aberrations in Human Spermatozoa. *Mutation research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 504 (1), 183-191, 2002.
15. Chen, C., Arjomandi, M., Qin, H., Balmes, J., Tager, I. and Holland, N. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. *Mutagenesis*. 21(2), 131-137, 2006.
16. Yager, J.W, Hines, C.J. and Spear, R.C. Exposure to ethylene oxide at work increases sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes. *Science*. 219, 1221-1223, 1983.
17. Mustonen, R., Kangas, J., Vuojolahti, P. and Linnainmaa, K. Effects of phenoxyacetic acids on the induction of chromosome aberrations in vitro and in vivo. *Mutagenesis*. 1(4), 241-245, 1986.
18. Luhr, O.R., Frostell, C.G., Heywood, R., Riley, S. and Lönnqvist, P.A. Induction of chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes after short time inhalation of nitric oxide. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 414(1-3), 107-115, 1998.

19. Sera, N., Fukuhara, K., Miyata, N. and Tokiwa, H. Micronucleus induction and chromosomal aberration of 1-and 3-nitroazabenzopyrene and their N-oxides. *Mutagenesis*. 16(3), 183-187, 2001.
20. Almeida Reis, S.R., Espírito Santo, A.R., Andrade, M.G.S. and Sadigursky, M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. *Braz. oral res.* 20(2), 97-102, 2006.
21. Biondi, O., Motta, S. and Mosesso, P. Low molecular weight polyethylene glycol induces chromosome aberrations in Chinese hamster cells cultured in vitro. *Mutagenesis*. 17(3), 261-264, 2002.
22. Beddowes, E.J, Faux, S.P., Chipman, J.K. Chloroform, carbon tetrachloride and glutathione depletion induce secondary genotoxicity in liver cells via oxidative stress. *Toxicology*. 3;187(2-3),101-15, 2003.
23. Burgaz, S., Erdem, O., Cakmak, G., Erdem, N., Karakaya, A. and Karakaya, A.E. Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde. *Biomarkers*. 7 (2), 151-61, 2002.
24. Paz-Y-Miño, C., Bustamante, G., Sánchez, M.E. and Leone, P.E. Cytogenetic Monitoring in a Population Occupationally Exposed to Pesticides in Ecuador. *Environ. Health. Perspect.* 110 (11), 1077-1080, 2002.
25. Kauderer, B., Zamith, H., Paumgarten, F.J. and Speit, G. Evaluation of the Mutagenicity of Beta-Myrcene in Mammalian Cells In Vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* 18 (1), 28-34, 1991.
26. Nair, B. and Elmore, A.R. Final report on the safety assessment of sodium sulfite, potassium sulfite, ammonium sulfite, sodium bisulfite, ammonium bisulfite, sodium metabisulfite and potassium metabisulfite. *Int J Toxicol.* 2, 63-88, 2003.
27. Ieradi, L.A., Zima, J., Allegra, F., Kotlanova, E., Campanella, L., Grossi, R. and Cristaldi, M. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zool.* 52(1), 57-66, 2003.
28. Miadoková, E., Miklovičova, M., Dúhová, V., Garajová, L., Böhmová, B., Podstavková, S. and Vlček, D. Effects of The Insecticide Pyrethroid II in the Ames Test, and on *Hordeum vulgare* and *Vicia faba*. *Biologia Plantarum (PRAHA)*. 33 (2), 156-162, 1991.
29. Pastor, S., Gutierrez, S., Creus, A., Xamena, N., Piperakis, S. and Marcos, R. Cytogenetic analysis of Greek farmers using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis*. 16, 539-45, 2001.
30. Almeida Santos, M.F.M., Ferrari, I. and Luna, H. Chromosomal aberration analysis in workers exposed to chemical and biological hazards in research laboratories. *Environmental Research.* 97(3), 330-334, 2005.