

**BAZI PARABENLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
IN VIVO VE IN VITRO ŞARTLARDA KISA SÜRELİ
TEST TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ**

Arif AYAR

**Doktora Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Doç. Dr. Handan UYSAL
2013
Her hakkı saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**BAZI PARABENLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *IN VIVO*
VE *IN VITRO* ŞARTLARDA KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ
İLE BELİRLENMESİ**

Arif AYAR

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her hakkı saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

**BAZI PARABENLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *IN VIVO* VE *IN VITRO*
ŞARTLARDA KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ**

Doç.Dr. Handan UYSAL danışmanlığında, **Arif AYAR** tarafından hazırlanan bu çalışma **04/02/2013** tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **Biyoloji** Anabilim Dalı'nda **Doktora** tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : **Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR**

İmza :

Üye : **Doç. Dr. Handan UYSAL (Danışman)**

İmza :

Üye : **Doç. Dr. Ünsal DOĞRU**

İmza :

Üye : **Doç. Dr. Şifa TÜRKÖĞLÜ**

İmza :

Üye : **Yrd. Doç. Dr. Hakan AŞKIN**

İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma **BAP** kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: **2010/45**

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

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI PARABENLERİN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *IN VIVO* VE *IN VITRO* ŞARTLARDA KISA SÜRELİ TEST TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

Arif AYAR

Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Handan UYSAL

Bu çalışmada gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan bazı parabenlerin (metilparaben, propilparaben, bütılparaben ve etilparaben) genotoksik ve sitotoksik etkileri, *in vivo* şartlarda *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), *in vitro* şartlarda ise insan periferik lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile ilk kez belirlenmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızın *in vivo* şartlarda yapılan bölümünde, meyve sineği olarak da bilinen *D. melanogaster*'in genomunda çekinik *flare* (*flr*³) ve çoklu kanat kılı (*mwh*) belirleyici genlerini taşıyan iki farklı mutant soyu kullanılmıştır. Bu iki mutant soy arasında yapılan çaprazlamalar sonucu elde edilen 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalar, farklı konsantrasyonlarda (100mM, 150mM, 200mM, 250mM) parabenlerle kronik olarak beslenmiştir. Ayrıca etil metansülfonat (EMS) ile pozitif ve çözücü olarak kullandığımız distile su ile de negatif kontrol gruplarına ait deney setleri hazırlanmıştır. Bu larvalardan gelişen ergin bireylerin kanat preparatları yapılmış ve bu preparatlar mikroskop altında incelenmiştir. Mikroskopik incelemelerden elde ettiğimiz verilerden, tüm paraben gruplarının yüksek konsantrasyonlar da dahil olmak üzere genotoksik etki göstermediği ancak artan konsantrasyona bağlı olarak toksik etki gösterip larvalarda yaşama yüzdesini azalttığı ve ergin bireylerde çeşitli malformasyonlara neden oldukları tespit edilmiştir.

Çalışmamızın *in vitro* şartlarda yapılan bölümünde ise farklı konsantrasyonlardaki (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) parabenlerin olası genotoksik, toksik ve mutajenik etkileri insan periferik lenfositlerinde araştırılmıştır. Bu amaçla *in vitro* kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri kullanılmış ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) ile replikasyon indeksi (Rİ) oranları hesaplanmıştır. Tüm *in vitro* çalışmalardan elde ettiğimiz verilere göre, parabenlerin KKD ve MN frekanslarını artırdığı ancak bu artışın önemli olmadığı sonucuna ulaşılmıştır ($p>0,01$). Bununla birlikte bütılparaben ve propilparabenin yüksek konsantrasyonlarda NBİ ve Rİ oranlarını azaltarak sitotoksik etki gösterdiği ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

2013, 136 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Drosophila melanogaster*, genotoksisite, insan lenfosit hücreleri, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus, parabenler, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

THE DETERMINATION OF THE GENOTOXIC EFFECTS VARIOUS PARABENS WITH SHORT TERM TEST METHODS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

Arif AYAR

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Handan UYSAL

In this study, the genotoxic and cytotoxic effects of some parabens (methylparaben, propylparaben, butylparaben and ethylparaben) have been examined the first time with somatic mutation and recombination test (SMART) for *Drosophila melanogaster* *in vivo* and sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) tests for the human peripheral lymphocyte cells *in vitro*.

During the *in vivo* part of our study, two different mutant species of *D. melanogaster* known also as the fruit fly with recessive *flare* (*flr*³) and *multiple wing hair* (*mwh*) identifier genes in their genomes have been used. The 72±4 hour trans-heterozygote larvae obtained by the cross-breeding of these two mutant species have been fed chronically with parabens at different concentrations (100mM, 150mM, 200mM and 250mM). In addition, experimental sets have been prepared using ethyl methanesulphonate (EMS) for positive and distilled water used as a solvent for the negative control groups. Wing preparations have been made for developing adult individuals using these larvae and these preparations have been examined under the microscope. The data obtained from microscopic examinations have shown that all paraben groups including those with high concentrations show no genotoxic effect but that based on the increasing concentration decrease the mortality in the larvae due to toxic effects and cause various malformations in adult individuals.

Whereas during the *in vitro* part of our study, the possible genotoxic, toxic and mutagenic effects of parabens with different concentrations (125, 250, 500 and 1000µg/mL) on the human lymphocytes have been examined. To this end, *in vitro* sister chromatid exchange (SCE) and micronucleus (MN) tests have been used and the nuclear division index (NDI) and the replication index (RI) ratios have been calculated. Based on the data obtained from all of our *in vitro* studies, it was determined that parabens increased the CSE and MN frequencies but that this increase was not significant ($p>0,01$). In addition, it was also determined that butylparaben and propylparaben decrease NDI and RI ratios at high concentrations there by showing cytotoxic effect and that this decrease was statistically significant ($p<0,01$).

2013, 136 pages

Keywords: *Drosophila melanogaster*, genotoxicity, human lymphocyte cells, micronucleus, parabens, somatic mutation and recombination test, sister chromatid exchange

TEŞEKKÜR

Doktora Tezi olarak sunduğum bu çalışmanın planlanlama ve gerçekleştirme aşamasında katkı, öneri ve desteklerini hiç esirgemedi benimle paylaşan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Handan UYSAL’a,

Çalışmam boyunca fikir ve önerileri ile yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ömer Faruk ALGUR’a,

Çalışmamın tümünü gerçekleştirdiğim Genetik Araştırma Laboratuvarı’nın tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Başkanlığı’na,

Çalışmamda kullandığım kimyasal maddelerin hazırlanması aşamasında teknik desteklerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Hasan SEÇEN’e ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde emeği geçen tüm hocalarıma,

Tezimin tüm aşamalarında bana destek ve yardımcı olan laboratuvar çalışma arkadaşlarım; Deniz ALTUN ÇOLAK, Sıdika SEMERDÖKEN GENÇ, Halit KIZILET ve Caner KASIMOĞLU’na,

Ayrıca bu çalışmanın önemli bir kısmını BAP–2010/45 nolu ve “Çeşitli Parabenlerin *Drosophila melanogaster*’de Genotoksik Etkilerinin Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile Belirlenmesi” adlı projeye destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı’na,

Ve en önemlisi, tezimin hazırlanması sürecinde bana manevi olarak desteklerini sürekli olarak hissettiren çok sevdiğim eşim Elif AYAR ve oğlum Ahmet Eren AYAR’a,

Teşekkür ederim.

Arif AYAR

Şubat, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Gıda Katkı Maddeleri (GKM)'nin Tanımı	2
1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar	3
1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması	5
1.4. Koruyucu (Antimikrobiyal) Gıda Katkı Maddeleri.....	8
1.5. Gıdalarda Kullanılan Koruyucu Katkı Maddeleri	10
1.6. Parabenler (Para-hidroksibenzoik asit esterleri).....	12
1.6.1. Metilparaben.....	14
1.6.2. Etilparaben.....	15
1.6.3. Propilparaben.....	15
1.6.4. Bütilparaben	16
1.7. Genetik Toksikoloji.....	16
1.7.1 Genetik toksikolojide kullanılan bazı test teknikleri.....	17
1.7.1.a. Kardeş kromatid değişimi testi (KKD).....	19
1.7.1.b. Mikronükleus testi (MN).....	23
1.7.1.c. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART).....	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kullanılan organizma	37
3.1.1.a. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in sistematigi	38
3.1.1.b. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in hayat döngüsü	39
3.1.2. <i>In vitro</i> çalışmalar için donör seçimi ve kan örneklerinin alınması	40

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	41
3.2. Yöntem	42
3.2.1. <i>In vivo</i> somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)	42
3.2.1.a. Çaprazlama için birey seçimi	47
3.2.1.b. Paraben çözeltilerinin hazırlanması ve deney gruplarına uygulanması	48
3.2.1.c. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması	49
3.2.1.d. Kanat preparatlarının mikroskopik analizi	50
3.2.1.e. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması	51
3.2.1.f. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi	52
3.2.2. <i>In vitro</i> kardeş kromatid değişimi (KKD) testi	53
3.2.2.a. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar	53
3.2.2.b. Hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması	55
3.2.2.c. Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması	56
3.2.2.d. Mikroskopik inceleme	57
3.2.3. <i>In vitro</i> mikronükleus (MN) testi	61
3.2.3.a. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar	61
3.2.3.b. Hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması	63
3.2.3.c. Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması	64
3.2.3.d. Mikroskopik inceleme	64
3.2.4. KKD ve MN testleri ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi	66
3.2.5. Mikrofotografi	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	68
4.1. Trans-heterozigot Larvalar İçin Hayatta Kalış Oranlarının (Larval Mortalite)	
Belirlenmesi	68
4.2. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile Elde Edilen	
Bulgular	73
4.2.1. Etil metansülfonat (EMS) uygulaması sonucu SMART ile elde edilen	
bulgular	77
4.2.2. Metilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular	79
4.2.3. Propilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular	81
4.2.4. Bütilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular	83
4.2.5. Etilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular	85

4.3. Kardeş Kromatid Değişimi Testi (KKD) ile Elde Edilen Bulgular.....	87
4.3.1. Metilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular.....	89
4.3.2. Propilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular.....	90
4.3.3. Bütilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular	92
4.3.4. Etilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular.....	93
4.4. Mikronükleus Testi (MN) ile Elde Edilen Bulgular.....	95
4.4.1. Metilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular	97
4.4.2. Propilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular	99
4.4.3. Bütilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular.....	100
4.4.4. Etilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular	101
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	104
KAYNAKLAR	122
ÖZGEÇMİŞ	137

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ADI	Kabul edilebilir günlük alım miktarı
<i>BdS</i>	Serratlık geni
BrdU	5-bromo-2-deoksiüridin
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
EMS	Etil metansülfonat
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FBS	Fetal Bovine Serum
<i>flr³</i>	<i>Flare</i> geni
g	Gram
GKM	Gıda katkı maddeleri
H ₀	Orijinal (null) hipotez
H _a	Alternatif hipotez
JECFA	Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi
JMPR	Pestisit Kalıntıları FAO/WHO Ortak Uzman Komitesi
KCl	Potasyum klorür
kg	Kilogram
KH ₂ PO ₄	Potasyum hidrojen fosfat
KİF	Klon indüksiyon frekansı
KKD	Kardeş kromatid değişimi
LD ₅₀	Bir popülasyondaki bireylerin yarısını öldüren doz
M	Molar
mg	Miligram
MEM	Minimum Esansiyel Medyum
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre

MN	Mikronükleus
MRL	Maksimum kalıntı limitleri
<i>mwh</i>	<i>multiple wing hair</i> =�oklu kanat kılığı geni
Na	Sodyum
Na ₂ HPO ₄	Sodyum hidrojen fosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
NBI	Nükleer bölünme indeksi
nm	Nanometre
NOEL	Yan etki ortaya çıkarmayan değer
O	Oksijen
PBS	Fosfat tamponu
R�	Replikasyon indeksi
rpm	Dakikada dönüş sayısı
SCF	Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi
SCGE	Tek hücre jel elektroforezi
SDB	Standart <i>Drosophila</i> besiyeri
SMART	Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi
<i>TM3</i>	Dengeleyici kromozom
U	�nite
WHO	Dünya Sağlık �rg�t�
α	Alfa
β	Beta
μ g	Mikrogram
μ M	Mikromolar
�C	Santigrat derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Parabenlerin kimyasal formülü	13
Şekil 1.2. Metilparabenin kimyasal formülü.....	14
Şekil 1.3. Etilparabenin kimyasal formülü.....	15
Şekil 1.4. Propilparabenin kimyasal formülü.....	15
Şekil 1.5. Bütilparabenin kimyasal formülü	16
Şekil 1.6. KKD oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	20
Şekil 1.7. MN oluşum mekanizmasının şematik gösterimi	24
Şekil 1.8. Somatik mutasyon ve rekombinasyonların oluşum mekanizmalarının şematik gösterimi	27
Şekil 3.1. <i>D. melanogaster</i> 'in Oregon R soyu (yabanıl tip) erkek ve dişi bireyleri.....	38
Şekil 3.2. <i>D. melanogaster</i> 'in hayat döngüsü	40
Şekil 3.3. <i>D. melanogaster</i> 'de imajinal diskler ve oluşturdıkları vücut kısımları	43
Şekil 3.4. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik gösterimi.....	44
Şekil 3.5. <i>D.melanogaster</i> 'de serrat ve normal kanatlı bireyler	45
Şekil 3.6. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri.....	46
Şekil 3.7. Çeşitli kanat benek tipleri	47
Şekil 3.8. Parabenlerin tuz formuna dönüştürülmesinin kimyasal gösterimi.....	48
Şekil 3.9. Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler.....	50
Şekil 3.10. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler	58
Şekil 3.11. 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak gösterimi.....	59
Şekil 3.12. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	60
Şekil 3.13. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar	60
Şekil 3.14. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar.....	61
Şekil 3.15. MN testi mikroskopik inceleme sahası genel görünümü.....	65
Şekil 3.16. Bir (a) ve iki (b) nükleus içeren hücreler	66
Şekil 3.17. Üç (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler	66

Şekil 4.1. Yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış larvalardan gelişen bireylerde gözlenen kanat malformasyonları	71
Şekil 4.2. Yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış larvalardan gelişen, birden fazla malformasyonu bir arada taşıyan bireyler	72
Şekil 4.3. a: yabanıl tip larva, b: yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış ve pupa evresine geçememiş larva	72
Şekil 4.4. a: yabanıl tip ergin birey, b: yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış küçük vücut yapısına sahip ergin birey	73
Şekil 4.5. Normal genetik özelliğe sahip bireylerdeki kanat kılları	74
Şekil 4.6. Küçük tek tip <i>mwh</i> mutant klon	74
Şekil 4.7. Büyük tek tip <i>mwh</i> mutant klon	75
Şekil 4.8. Büyük tek tip <i>flr³</i> mutant klon	75
Şekil 4.9.a <i>flr³</i> ve <i>mwh</i> mutant klonları birlikte taşıyan ikiz klon	76
Şekil 4.9.b <i>flr³</i> ve <i>mwh</i> mutant klonları birlikte taşıyan ikiz klon	76
Şekil 4.10. İnsan periferel lenfositlerinde distile su kontrol grubuna ait kardeş kromatid değişimi	87
Şekil 4.11. İnsan periferel lenfositlerinde EMS uygulama grubuna ait kardeş kromatid değişimi	88
Şekil 4.12. İnsan periferel lenfositlerinde paraben uygulama grubuna ait kardeş kromatid değişimi	88
Şekil 4.13. Mikronükleus taşımayan binükleuslu hücreler	95
Şekil 4.14. Tek mikronükleus (MN) taşıyan binükleuslu hücreler	96
Şekil 4.15. a) Çift mikronükleus (MN) ve b) üç mikronükleus (MN) taşıyan binükleuslu hücreler	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>Drosophila</i> Lewis besin ortamının içeriği	38
Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddeler	41
Çizelge 3.3. Kromozom medyumunun her 100ml'sinde bulunan madde ve miktarları	42
Çizelge 3.4. Faure solüsyonunun içeriği	50
Çizelge 3.5. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi	52
Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda parabenlere maruz kalan trans-heterozigot larvaların hayatta kalış ve mortalite oranları	70
Çizelge 4.2. EMS uygulaması sonucunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi ile elde edilen bulgular	78
Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda metilparaben uygulaması sonucunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi ile elde edilen bulgular	80
Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda propilparaben uygulaması sonucunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi ile elde edilen bulgular	82
Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda bütılparaben uygulaması sonucunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi ile elde edilen bulgular	84
Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda etilparaben uygulaması sonucunda <i>Drosophila</i> kanat benek testi ile elde edilen bulgular	86
Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda metilparaben uygulaması sonucu insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri	90
Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda propilparaben uygulaması sonucu insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri	91
Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda bütılparaben uygulaması sonucu insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri	93
Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda etilparaben uygulaması sonucu insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri	94
Çizelge 4.11. Farklı konsantrasyonlarda metilparaben uygulaması sonucu insan periferel lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri	98

Çizelge 4.12. Farklı konsantrasyonlarda propilparaben uygulaması sonucu insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri	99
Çizelge 4.13. Farklı konsantrasyonlarda bütılparaben uygulaması sonucu insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri	101
Çizelge 4.14. Farklı konsantrasyonlarda etilparaben uygulaması sonucu insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri	102

1. GİRİŞ

Teknolojinin ilerlemesiyle gıda sektöründe değişik üretim tekniklerinin gelişmesi, gıda ürünlerinin çeşitlenmesi, yılın her döneminde mevsimlik gıdaların tüketilmek istenmesi, ürünlerde raf ömrünün uzatılması gibi hususlar gıda endüstrisinde kullanılan tekniklerle birlikte gıda katkı maddeleri (GKM)'nin kullanımını da zorunlu hale getirmiştir (Yurttagül ve Ayaz 2008).

Gıdalara kimyasal madde katılımının tarihsel gelişimi incelendiği zaman en eski katkı maddelerinin tuz ve odun tütsüsü olduğu anlaşılmaktadır. M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini kürelemede (üründe görünüm, renk, tat, aroma ve lezzet gibi özellikleri iyileştirmek ve dayanıklılığını artırmak amacıyla uygulanan işlem) tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemi olarak kullanıldığı görülmektedir. Ortaçağda tuz ve odun tütsüsüne ilaveten etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve botulizmi (evde yapılmış konserve başta olmak üzere toksin içeren gıdaların yenmesiyle oluşan hastalık) önlemek amacıyla nitratin kullanıldığı, günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce ise Mısırlılar tarafından renklendirme amacıyla gıda boyalarının kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. 19. yüzyılda başlayan endüstrileşme paralelinde GKM'nin kullanımında da artış başlamıştır. Bu yüzyılda gıdalara katılmaya başlayan benzoik asit, sodyum, karbonat ve sakkarin gibi birçok kimyasal madde günümüzde de gıda katkısı olarak kullanılmaktadır (Altuğ 1999). Bununla birlikte, 20. yüzyılın başında, bitkisel, hayvansal ve mineral kaynaklı yaklaşık 1000 adet kimyasal madde kullanılmakta iken, bugün 100 000 civarında kimyasal madde, çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır. Resmi rakamlara göre kimyasal maddelerin kullanımı 1930'da 1 milyon ton/yıl, 1950'de 7 milyon ton/yıl, 1970'de 63 milyon ton/yıl, 1985'de 250 milyon ton/yıl'a yükselirken 2000'li yıllarda bu rakam 400 milyon ton/yıl'a ulaşmıştır (Altuğ vd 2000).

1.1. Gıda Katkı Maddeleri (GKM)'nin Tanımı

1938 yılında yayımlanan ve halen ABD’de yürürlükte olan Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası (The Federal Food, Drug, and Cosmetic, (FD&C Act)’nda belirtilen tanımda GKM “belirli bir amaçla kullanımları sırasında doğrudan veya dolaylı olarak gıdanın bileşeni haline gelen veya özelliklerini değiştiren maddeler” olarak tanımlanmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO)’nın ortak çalışmaları ile oluşturulmuş Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) tarafından verilen tanımda ise GKM,” tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın imalat, işleme, hazırlama, uygulama, paketlenme, ambalajlama, taşıma, muhafaza ve depo aşamalarında gıdalara teknolojik amaçla katılan ya da bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların özelliklerini değiştiren maddeler” olarak ifade edilmektedir (Altuğ ve Elmacı 2001).

Ülkemizde Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı’nın son olarak 29 Aralık 2011 tarihli 28157 sayılı Resmi Gazete’de yayınladığı ‘Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği’nde GKM, “tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, besleyici değeri olan veya olmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisi ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddeler” olarak tanımlanmıştır (TGK 2011).

1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar

İlk ticari amaçlı GKM, 1886 yılında ABD’de tuz ve kalsiyum fosfat karışımı bir preparat halinde üretilmiş ve çeşni maddesi olarak piyasaya sürülmüştür. Bu tarihten itibaren gelişen teknoloji ile birlikte ticari amaçlı GKM’nin sayısı hızla artmıştır. Bu gelişmeler sonucunda ortaya çıkan sağlık problemlerindeki artış dünya sağlık örgütlerini hareketlendirmiş ve 30 Haziran 1906 tarihinde “Wiley Yasaları” olarak bilinen “Gıda ve İlaç Yasası” yayınlanmıştır. Bu yasa, 200’den fazla madde içeren, halk sağlığı ve tüketici korumasına yönelik dünyanın kapsamlı ilk yasasıdır (Johnson 1982). Sahte ve markasız ilaç ve gıdaların pazarlanmasını yasaklayan bu yasadan sonra, 1937 yılında yasal olarak pazarlanan bazı katkı maddelerinin çocukları da içeren 107 kişinin ölümüne neden olmasıyla bu yasanın geliştirilmesi ve revize edilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, 1938 yılında “Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası” çıkarılmıştır. Bu yasa, halk sağlığı sistemi açısından tamamen revize edilmiş ve yeni ilaçların güvenliğini kanıtlama, uygun etiketleme ve saflığını sağlama, gıdalar için standartların belirlenmesi, fabrika denetimleri gibi birçok alanda “İlaç ve Gıda İdaresi” (Food and Drug Administration; FDA) yetkili kılınmıştır (Saldamlı 1985). Bununla birlikte GKM’nin güvenli kullanımı için günümüzde daha birçok kurum ve kuruluş görev yapmaktadır. Aşağıda bu kurumlara bazı örnekler verilmiştir (Karakaya 1988);

Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission: CAC):

Birleşmiş Milletler’e bağlı bir kuruluştur. Kuruluşun görevi dünyada gıda ile ilgili uygulamaların sağlık ve teknoloji yönünden standartlaştırılmasıdır. Kuruluşun bu amaçla hazırladığı “Codex Alimentarius” tüm dünya ülkeleri için güvenli gıda üretiminde referans olan önemli bir dökümandır. Bu komisyonun kuruluşuna giden süreç, 1945 yılında Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) ve 1948 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO)’nün kurulması ile başlamıştır. 1950’lerden sonra gıda güvenliği konusundaki uluslararası işbirliği giderek artmış ve 1961 yılında FAO tarafından “Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu” kurulmuştur. Komisyon, WHO ile işbirliği içinde çalışmalar yürütmüştür. Daha sonraki yıllarda da FAO ve WHO gıda

güvenliğini hedefleyen ortak komisyonlar kurmuşlardır. İki yılda bir toplanarak, komiteler aracılığıyla görevini yürüten bu komisyona bugün 165 ülke üyedir.

Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: JECFA): 1956 yılından beri gıda katkı maddelerinin insan sağlığı yönünden değerlendirilmesi için toplanan FAO/WHO ortak uzmanlar komitelerine verilen isimdir. Bu komiteler gündemlerine aldıkları gıda katkı maddeleri için tüm bilimsel verileri inceleyerek değerlendirmeler yapmakta ve ADI (Kabul edilebilir günlük alım miktarı =Acceptable Daily İntake) değerlerini tespit etmektedir. Komiteler çalışmalarında gıda kontaminantları ve veteriner ilaçlarını da göz önüne alarak ADI ve MRL (Maksimum kalıntı limitleri=Maximum Residue Level) değerlerini oluşturmaktadır (Benford 2000).

Pestisit Kalıntıları FAO/WHO Ortak Uzman Komitesi (The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues: JMPR): JMPR, gıda ürünlerindeki pestisit kalıntılarını değerlendiren FAO/WHO ortak kuruluşu olup 1966 yılından bu yana görev yapmaktadır. Gıdaların günlük alımında insan sağlığına zarar vermeyecek maksimum pestisit miktarları JMPR tarafından belirlenir.

Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (Eu - Scientific Committee on Food: SCF): Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili toksikoloji, hijyen ve beslenme konularında yetkili komitesidir. 1974 yılında kurulmuştur. SCF, CAC, JECFA, JMPR ve FDA gibi kuruluşların dokümanlarından da yararlanarak raporlarını hazırlar. Bu raporlar Avrupa Topluluğu'nun karar süreçlerinde değerlendirilerek "Avrupa Topluluğu Direktifleri=EC Directives" olarak uygulamaya girer. Ülkemizde de kullanılan 'E' kodları SCF tarafından verilen kodlardır. Bu kodlarda her yüzölçümü bir kullanım grubunu temsil eder (100-199 arası renklendiriciler, 200-299 koruyucular gibi). Bununla birlikte kullanılmasına izin verilen ve 'E' kodu alan bazı katkı maddeleri için birçok ülke tarafından sınırlamalar getirilmiştir. Nitekim listelerde izin verildiği halde bazı katkı maddelerini Amerika, Avusturya ve Avrupa kendi ülke sınırları içerisinde yasaklamıştır.

Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration: FDA):

Yukarıda belirtilen kuruluşlar içerisinde en eski kuruluş tarihine sahip olanıdır. 1931 yılında kurulmuştur. Her ne kadar ABD'nin ulusal kuruluşu ise de dünya ülkelerinin referans olarak kabul ettiği bir konumdadır.

Ülkemizde katkı maddeleri ile ilgili olarak ilk kez 1983 yılında Sağlık ve Sosyal Yardım Bakanlığı tarafından bir yönetmelik çıkarılmış ve 1984 yılında buna ek bir yönetmelik yürürlüğe girmiştir. 1990 yılında yine Sağlık Bakanlığı bu konu ile ilgili olarak yeni bir yönetmelik çıkarmış ve bunu takip eden yıllarda bu yönetmeliğe çeşitli eklemeler yapılmıştır. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı'na hazırlanmış olan ve 16 Kasım 1997 tarihinde yayınlanan Resmi Gazete ile yürürlüğe giren 'Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği' ile katkı maddelerinin kullanımları konusunda yeni düzenlemeler getirilmiştir. Söz konusu kodekste gıda katkı maddeleri tanımlanmış ve bu maddelerin 'E' kodları, adları, kullanılabilecekleri gıda grupları ve izin verilen maksimum miktarları listeler halinde açıklanmıştır.

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde 300 civarında gıda katkı maddesinin çeşitli gıdalarda değişen miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir.

1.3. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

GKM'ler kullanım amaçlarına göre 4 ana grupta toplanmıştır. Bunlar;

1. Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar

- Antimikrobiyaller
- Antioksidanlar

2. Yapıyı, hazırlama ve pişme özelliğini geliştirenler

- pH ayarlayıcılar
- Topaklanmayı önleyiciler
- Emülsifiyerler
- Stabilizörler, kıvam arttırıcılar, tatlandırıcılar

- Mayalanmayı sağlayıcı ajanlar
- Nem ayarlayıcılar
- Olgunlaştırıcılar
- Ağartıcılar, dolgu maddeleri, köpük ayarlayıcılar, parlaticılar

3. Aromayı ve rengi geliştiriciler

- Çeşni arttırıcılar
- Çeşni vericiler
- Renklendiriciler

4. Besin değerini koruyucu ve geliştiriciler

- İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koyma (B1, B2 ve niasin)
- Diyetle eksik olabilecek besin öğelerini ekleme (A ve D vitaminleri)

AB ortak mevzuatında ise GKM 3 ana başlık altında gruplandırılmıştır.

1. Renklendiriciler

2. Tatlandırıcılar

3. Renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışındaki gıda katkı maddeleri

“Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği” kapsamında, renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışında yer alan gıda katkı maddelerinin fonksiyonlarının tanımları aşağıdaki gibidir;

a) Ambalajlama gazları: Gıda maddesi kaba yerleştirilmeden önce, yerleştirilirken veya yerleştirildikten sonra kap içine verilen hava dışındaki gazlardır.

b) Antioksidanlar: Yağların acılaşması ve renk değişikliği gibi oksidasyonun neden olduğu bozulmaları önleyerek, gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddelerdir.

c) Aroma arttırıcılar: Gıdanın mevcut tat ve/veya kokusunu arttıran maddelerdir.

ç) Asitler: Asitliği arttıran ve/veya gıdada ekşi bir tat oluşumunu sağlayan maddelerdir.

d) Asitlik düzenleyiciler: Gıdaların asitlik veya alkaliliğini değiştiren veya kontrol eden maddelerdir.

- e) Emülgatörler:** Bir gıda maddesinde, yağ ve su gibi birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın homojen bir karışım oluşturmalarını veya oluşan homojen karışımın sürekliliğini sağlayan maddelerdir.
- f) Emülsifiye edici tuzlar:** Peynirde bulunan proteinleri çözünür hale getirerek yağ ve diğer bileşenlerin homojen dağılımını sağlayan maddelerdir.
- g) Hacim arttırıcılar:** Gıdaların faydalanılabilir enerji değerini önemli ölçüde değiştirmeden, gıdaların hacmini arttıran maddelerdir.
- ğ) İtici gazlar:** Gıdanın bulunduğu kaptan dışarı çıkmasını sağlayan hava dışındaki gazlardır.
- h) Jelleştiriciler:** Jel oluşumu ile gıdada farklı bir yapı oluşturan maddelerdir.
- ı) Kabartıcılar:** Gaz oluşturarak hamurun/yumurtalı soslu hamurun hacmini arttıran madde veya madde karışımlarıdır.
- i) Kıvam arttırıcılar:** Gıdanın kıvamını arttıran maddelerdir.
- j) Koruyucular:** Gıdaların mikroorganizmalarla bozulmalarını önleyerek, raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddelerdir.
- k) Köpük oluşturunucular:** Sıvı veya katı gıdalarda, gaz fazın homojen dağılımını sağlayan maddelerdir.
- l) Köpüklenmeyi önleyiciler:** Köpüklenmeyi azaltan veya önleyen maddelerdir.
- m) Metal bağlayıcılar:** Metalik iyonlarla kimyasal kompleks oluşturan maddelerdir.
- n) Modifiye nişastalar:** Fiziksel veya enzimatik uygulamaya, asit veya alkali ile inceltmeye veya ağartmaya tabi tutulmuş olsun veya olmasın yenilebilir nişastaların bir veya daha fazla kimyasal işleme tabi tutulması ile elde edilen maddelerdir.
- o) Nem vericiler:** Gıda maddelerinin düşük nemli ortamdan etkilenip kurummasını önleyen veya toz gıdaların sıvı ortamlarda çözünmesini kolaylaştıran maddelerdir.
- ö) Parlaticılar:** Yağlayıcılar da dahil, gıdaların dış yüzeyine uygulandığında parlak bir görünüm veren veya koruyucu bir tabaka sağlayan maddelerdir.
- p) Sertleştiriciler:** Meyve ve sebzelerin yapısını koruyan ya da dokularını sert veya gevrek hale getiren veya mevcut jelleştiriciler ile reaksiyona girerek jel oluşumunu sağlayan veya güçlendiren maddelerdir.
- r) Stabilizörler:** Gıdaların fiziko-kimyasal durumlarını korumalarını sağlayan; gıdada bulunan iki veya daha fazla birbiri ile karışmayan fazın homojen dağılımının sürekliliğini sağlayan, gıdaların var olan renklerini koruyan veya kuvvetlendiren,

proteinler arası çapraz bağ oluşturarak gıda parçacıklarının bağlanmasının sağlanması ile gıdaların bağlanma kapasitelerini artıran maddelerdir.

s) Taşıyıcılar: Taşıyıcı çözücüler dahil olmak üzere, gıda katkı maddelerini ve aromaları çözmek, seyreltmek veya bunların dağılımını sağlamak için kullanılan ya da herhangi bir teknolojik etki göstermeden gıda katkı maddeleri ve aromaları fiziksel yollarla modifiye ederek, bu maddelerin teknolojik fonksiyonlarını değiştirmeden, uygulama ve kullanımını kolaylaştıran maddelerdir.

ş) Topaklanmayı önleyiciler: Gıda parçacıklarının birbirine yapışma eğilimini azaltan veya önleyen maddelerdir.

t) Un işlem maddeleri: Hamurun işlenme ve pişirilme kalitesini geliştirmek amacı ile una veya hamura ilave edilen, emülgatörler dışındaki maddelerdir.

1.4. Koruyucu (Antimikrobiyal) Gıda Katkı Maddeleri

İnsanların toplu halde yaşamaya başlamaları ile birlikte gıdaların korunması amacıyla güvenilir yöntemlerin kullanılması gereksinimi ortaya çıkmıştır. Tarımsal uygulamalardaki değişiklikler, dayanıksız gıdaların diyetle fazlaca yer alması, gelişmiş dağıtım sistemlerindeki kontaminasyon olasılığının artması, kolay ve pratik gıdalara yönelme gibi nedenler gıdaları koruma tekniklerinin gelişmesini zorunlu kılmıştır. Endüstride kullanılan koruma yöntemlerinin başlıcaları ısıtma, dondurma, kurutma ve ışınlamadır. Ancak bunların uygulanamadığı ya da yetersiz kaldığı durumlarda gıdalara koruyucu madde katılımı söz konusu olmaktadır. Koruyucu maddeler, gıdayı mikroorganizmaların sebep olduğu bozulmalara karşı koruyarak, gıdanın raf ömrünü uzatan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır.

Koruyucuların antimikrobiyal özellikleri; maddenin antimikrobiyal spektrumu, kimyasal ve fiziksel özellikleri, konsantrasyonu, etki şekli, gıdanın bileşimi, işlem şartları, pH'sı ve depolama sıcaklığı gibi faktörlere bağlıdır. Kimyasal maddenin çok farklı tipteki mikroorganizmaların hepsi üzerine etkin olması mümkün değildir. Antimikrobiyal maddeler mikroorganizmaların büyümelerini durdurucu (bakteriyostatik, fungistatik) ya da onları öldürücü (bakteriosidal, fungisidal, sporosidal)

etki gösterebilmektedir. Bazı kimyasal maddelerin çok düşük miktarları bazı mikroorganizmalar tarafından besin maddesi olarak kullanılabilir. Ancak bu miktarlar diğer mikroorganizmalar üzerinde inhibe edici etki gösterebilmekte veya daha yüksek düzeyleri bazı mikroorganizmaları öldürebilmektedir (Kilcast and Subramaniam 2000). Antimikrobiyal maddenin kimyasal aktivitesi, yani gıdanın bileşenleri ve gıda katkıları ile reaksiyona girmesi antimikrobiyal aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca bu kimyasal reaksiyonlar sonucunda gıdada istenmeyen bazı değişimler de oluşabilmektedir. Temel gıda bileşenlerinin dışında gıdanın yapısında doğal olarak oluşan bazı bileşikler de antimikrobiyal etkiye sahip olabildikleri gibi, gıdada kullanılan antimikrobiyal madde üzerinde sinerjistik veya antagonistik etki gösterebilmektedir (Singh 1994). Antimikrobiyal maddenin etkinliği, gıda ürünlerinin özellikleri ile de yakından ilişkili olup, yukarıda da belirtildiği gibi, gıdanın pH'sı veya gıda bileşenleri ile reaksiyonlar bu aktiviteyi etkilemektedir. Pek çok koruyucunun aktivitesi asidik gıdalarda artmaktadır. Sıvı gıdalarda koruyucu maddeler mikroorganizmalarla daha iyi temas edebilmektedir. Bu nedenle katı gıda parçalarının içinde bulunan mikroorganizmalar kimyasal maddelerin etkilerinden daha iyi korunurlar. Genellikle gıdanın sıcaklığının artması, kimyasal maddelerin mikroorganizmalar üzerindeki etkisini de artırmaktadır. Sıcaklık mikroorganizmaların optimum sıcaklığına yakın ise antimikrobiyal madde etkisini tam olarak gösterememekte, sıcaklık mikroorganizmanın optimum gelişme sıcaklığının üzerinde ise koruyucunun etkinliği de artmaktadır (Koçak 2006).

Kimyasal koruyucular, mikroorganizmaları birçok mekanizma ile etkilemektedir. Bunlar; proteinlerin denatürasyonu, enzimlerin inhibisyonu, DNA'nın, hücre çeperinin ya da sitoplazmik membranın tahrip edilmesi veya değiştirilmesi, hücre duvarı sentezinin baskılanması ya da esansiyel metabolitlerle rekabet şeklinde olabilmektedir (Briel and Coote 1999).

Koruyucular meyve-sebze ürünlerinde, et ve et ürünlerinde, su ürünlerinde, süt ürünlerinde, margarinlerde, hububat ürünlerinde ve alkollü içecekler gibi pek çok gıda ürününde kullanılmaktadır.

1.5. Gıdalarda Kullanılan Koruyucu Katkı Maddeleri

Gıdalarda sıkça kullanılan koruyucu katkı maddeleri ve 'E' kodları aşağıda listelenmiştir. Bunlar;

a) Asetik asit ve asetatlar

- Asetik asit (E 260)
- Potasyum asetat (E 261)
- Sodyum asetat (E 262)
- Kalsiyum asetat (E 263)

b) Benzoik asit ve tuzları

- Benzoik asit (E 210)
- Sodyum benzoat (E 211)
- Potasyum benzoat (E 212)
- Kalsiyum benzoat (E 213)

c) Sorbik asit ve tuzları

- Sorbik asit (E 200)
- Sodyum sorbat (E 201)
- Potasyum sorbat (E 202)
- Kalsiyum sorbat (E 203)

d) Propionik asit ve tuzları

- Propionik asit (E 280)
- Sodyum propionat (E 281)
- Kalsiyum propionat (E 282)
- Potasyum propionat (E 283)

e) Parabenler (Para-hidroksibenzoik asit esterleri)

- Etil p-hidroksibenzoat (E 214)
- Sodyum etil p-hidroksibenzoat (E 215)
- Propil p-hidroksibenzoat (E 216)
- Sodyum propil p-hidroksibenzoat (E 217)

- Metil p-hidroksibenzoat (E 218)
- Sodyum metil p-hidroksibenzoat (E 219)
- Bütıl p-hidroksibenzoat

f) Kükürt dioksit ve sülfıtlr

- Kükürt dioksit (E 220)
- Sodyum sülfıt (E 221)
- Sodyum hidrojen sülfıt (E 222)
- Sodyum metabisülfıt (E 223)
- Potasyum metabisülfıt (E 224)
- Potasyum sülfıt (E 225)
- Kalsiyum hidrojen sülfıt (E 227)
- Potasyum bisülfıt (E 228)
- Sodyum thiosülfat (E 539)

g) Nitrit ve Nitratlar

- Potasyum nitrit (E 249)
- Sodyum nitrit (E 250)
- Sodyum nitrat (E 251)
- Potasyum nitrat (E 252)

ğ) Koruyucu gazlar

- Karbondioksit
- Etilen oksit
- Propilen oksit
- Karbonmonoksit
- Ozon

h) Antibiyotikler

- Nisin (E 234)
- Natamisin (E 235)

ı) Diğır koruyucular

- Tiabendazol (E 233)
- Formik asit ve formatlar
- Formaldehit

- Hekzametilen tetramin
- Borik asit (E 284)
- Sodyum tetraborat (E 285)
- Difenil (E 230)
- Orto-fenil fenol (E 231)
- Sodyum orto-fenilfenol (E 232)
- Kalsiyum disodyum etilen-diamin-tetra-asetat (E 385)
- Disodyum etilendiamin-tetra-asetat (E 386)
- Lisozim (E 1105)

1.6. Parabenler (Para-hidroksibenzoik asit esterleri)

Parabenler, para-hidroksibenzoik asidin esterleridir ve paraben ismi de buradan gelmektedir. Parabenler gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde koruyucu olarak yaygın biçimde kullanılan bir grup kimyasaldır. Raf ömrünü uzatıcı olarak kullanılan bu bileşikler, aslında bakteri ve mantarları yok edici özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir (Neves *et al.* 2009). En çok kullanılan parabenler; metilparaben (E218), etilparaben (E214), propilparaben (E216) ve bütılparabendir. Bunlardan başka izobütılparaben, izopropilparaben, benzilparaben ve parabenlerin tuz formları da bulunmaktadır.

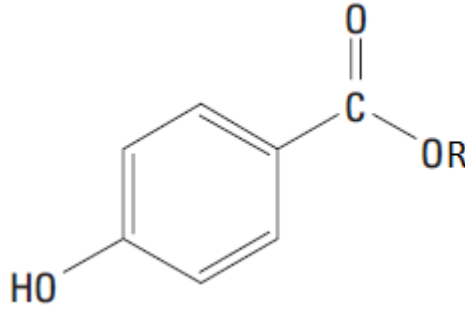
Parabenler, kokusuz, renksiz olup uçucu değildirler. Geniş antimikrobiyal etki spektrumuna sahip olmaları, kullanımlarının güvenli olması, diğer ajanlara göre daha az iritasyon yapmaları, daha az toksik olmaları, daha az oranda duyarlılığa yol açmaları ve geniş pH aralığı içinde stabil kalabilmeleri nedeniyle ideal bir koruyucu olarak tanımlanmışlardır.

Soni *et al.* (2005)'e göre parabenlerin kullanım alanları;

- Gıda endüstrisinde; Salata sosları, mayonez, hardal, ketçap, dondurulmuş gıdalar, sebzeler, reçeller ve meyve suları

- İlaç sanayinde; Krem-merhem şeklindeki ilaçlar, göz, kulak ve burun damlaları, rektal-vajinal ilaçlar, bandajlar, lokal anestezi ilaçlar, antibiyotikler, kortikosteroidler, lokal anestezi ilaçlar, vitaminler, antihipertansifler, diüretikler, insülin, heparin ve bazı kemoterapötik ajanlar
- Kozmetik sektöründe; Fondöten, pudra, göz farı, maskara, makyaj temizleyiciler, ruj, oje, nemlendirici losyon ve kremler, diş macunu, diş tozu ve temizleyicileri, güneş yağları, cilt temizleyicileri, terlemeyi önleyici deodorantlar, sabunlar, şampuanlar ve tıraş jelleri.

Parabenlerin kimyasal formülü, Şekil 1.1’de gösterilmiştir. Şekil 1.1’deki R; metil, etil, propil veya bütül gibi alkali grupları temsil etmektedir.



Şekil 1.1. Parabenlerin kimyasal formülü

Parabenler, küf ve mayalara karşı çok etkili iken, gram (-) bakterilere karşı düşük aktivite göstermektedirler. Unlu mamüllerde (kekler, ekmek kabuğu, dolgu malzemeleri vb.), hafif içeceklerde, balıkta, aroma ekstraktlarında, meyve ürünlerinde, jelatin, reçel, jel, malt ekstraktlarında, zeytinde, turşuda, salata soslarında, şuruplarda ve şarapta sıklıkla kullanılır.

Parabenlerin tamamına yakın kısmının ticari şekli toz haldedir. Kokusuz olup hidroliz reaksiyonlarına karşı dayanıklıdır. Parabenlerin sudaki çözünürlüğü ester grubundaki karbon sayısı ile ters orantılı, antifungal etkisi ise alkil zincirinin uzunluğu ile doğru orantılıdır. Ancak zincir uzunluğu çözünürlüğü azalttığı için kısa zincirli esterler tercih

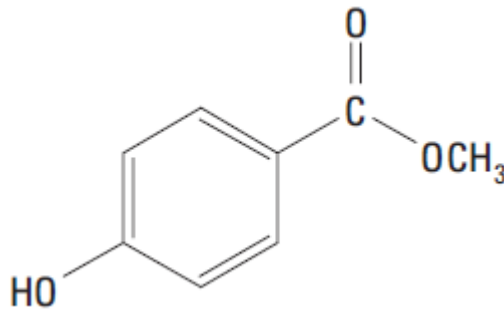
edilmektedir. Yapılan araştırmalar parabenlerin karışım halinde kullanılması durumunda karışımdaki esterlerin tek tek kullanımına kıyasla daha fazla antifungal etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

FDA, metil ve propilparabenleri gıdalarda %0,1 oranına kadar kullanıldıklarında güvenli olarak tanımlamaktadır. Metil ve propilparaben karışımı (3:1), %0,03–0,06 oranında mayasız üretilen unlu mamullerde, metil ve propilparaben karışımı (2:1) %0,03–0,05 oranında karbonatlı içeceklerde de koruyucu olarak kullanılabilir. Bunların dışında sucuk ve sosis gibi ürünlerde küflenmeyi önlemek amacı ile kılıflar %3,5'lik propilparaben çözeltisine daldırılır. Yine etil ve metilparaben gıda ambalaj materyallerinde antimikotik olarak kullanılabilir.

Çalışmamızda kullandığımız parabenlerin 'E' kodları ve kimyasal yapıları aşağıda sıralanmıştır.

1.6.1. Metilparaben (E-218):

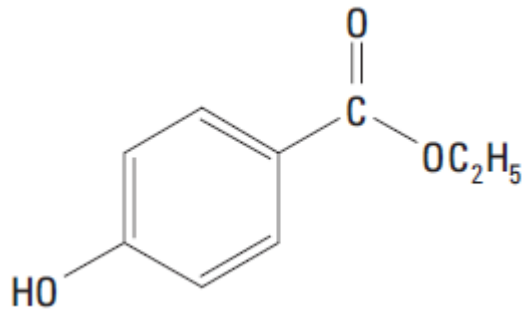
- **Diğer isimleri:** Nipagin M, metil-p-hidroksibenzoat, metil parahidroksibenzoat, metil 4-hidroksibenzoat.
- **Kimyasal formülü:** $C_8H_8O_3$ (şekil 1.2)
- **Molekül ağırlığı:** 152,15g/mol



şekil 1.2. Metilparabenin kimyasal formülü

1.6.2. Etilparaben (E-214):

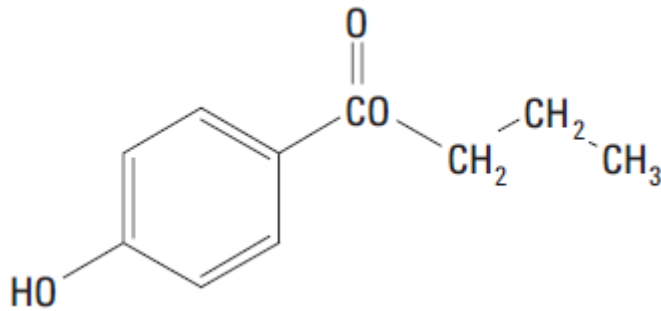
- **Diğer isimleri:** Nipagin A, etil-p-hidroksibenzoat, etil parahidroksibenzoat, etil 4-hidroksibenzoat.
- **Kimyasal formülü:** $C_9H_{10}O_3$ (Şekil 1.3)
- **Molekül ağırlığı:** 166,17g/mol



Şekil 1.3. Etilparabenin kimyasal formülü

1.6.3. Propilparaben (E-216):

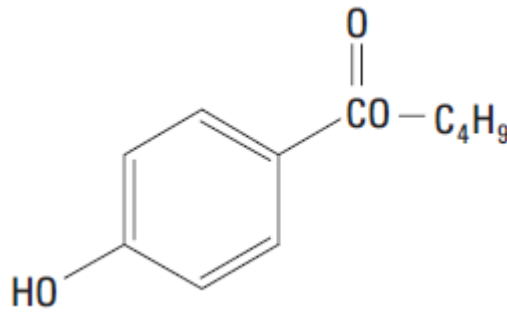
- **Diğer isimleri:** Nipasol M, propil-p-hidroksibenzoat, propil parahidroksibenzoat, propil 4-hidroksibenzoat.
- **Kimyasal formülü:** $C_{10}H_{12}O_3$ (Şekil 1.4)
- **Molekül ağırlığı:** 180,2g/mol



Şekil 1.4. Propilparabenin kimyasal formülü

1.6.4. Bütılparaben:

- **Diğer isimleri:** Nipabütyl, bütıl-p-hidroksibenzoat, bütıl parahidroksibenzoat, bütıl 4-hidroksibenzoat.
- **Kimyasal formülü:** $C_{11}H_{14}O_3$ (Şekil 1.5)
- **Molekül ağırlığı:** 194,227g/mol



Şekil 1.5. Bütılparabenin kimyasal formülü

1.7. Genetik Toksikoloji

İlk olarak 1927’de X ışınlarının *Drosophila*’da mutasyon oranlarını normalden 15 000 kat daha fazla arttırdığını belirleyen Müller’in çalışmaları ile başlayan genetik toksikoloji bugün, gelişen teknoloji ile artan risk ve analiz yöntemlerine bağlı olarak en önemli araştırma dallarından biri haline gelmiştir (Çavaş 2004).

Toksikolojinin bir alt dalı olan genetik toksikoloji, organizmanın normal biyolojik işleyişi sırasında veya kimyasal, fiziksel ve biyolojik etkenlere bağlı olarak hücrelerin DNA moleküllerinde meydana gelen değişiklikleri inceleyen bir bilim dalıdır (Choy 2001; Young 2002; Vural 2005). “Genetik toksisite” ya da “genotoksisite”; çekirdek, kromozom ve DNA yapısında meydana gelen DNA eklentileri, DNA kırıkları, gen mutasyonları, kromozom yapısı anormallikleri ve anöploid gibi hasarları kapsayan genel bir terimdir. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle

etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA’da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise “genotoksik etki” olarak tanımlanmaktadır (Zeiger 2004).

Bir genotoksisite test yönteminde olması istenen temel özellikleri şöyle sıralayabiliriz;

- Uygulama açısından basit olması,
- Genetik hasarları belirlemede etkin olması,
- Hızlı sonuç vermesi,
- Ekonomik açıdan ucuz olması,
- Analiz için az sayıda örneğin yeterli olması.

Genetik toksikoloji testlerinde ana hedef DNA molekülü olduğundan, herhangi bir organizmadan elde edilen sonuçlar aynı zamanda insan sağlığı ile ilgili olarak ortaya çıkabilecek problemlerin tahmininde de kullanılabilir. Bu nedenle bir türde DNA hasarı oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, diğer türlerde de benzer etkiler gösterebileceğini söylemek mümkündür. Bugün genotoksik etkilerin incelenmesi amacı ile mikroorganizmalar, böcekler, bitkiler ve omurgalı hayvanlar üzerinde uygulanabilecek 200’den fazla kısa süreli test metodu bulunmaktadır.

1.7.1. Genetik toksikolojide kullanılan bazı test teknikleri

Genetik toksisite ya da genotoksisite testleri 1920’lerden beri kullanılmaktadır. Bu tarihten günümüze kadar mutajenik ve genotoksik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir. Bu testler, çeşitli mekanizmalarla doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş *in vitro* ve *in vivo* testlerden oluşmaktadır (Vural 2005). *In vitro* mutajenite testlerinde genotoksik etkisi araştırılacak olan madde, deney hayvanından veya insandan alınan dokulara belli konsantrasyonlarda uygulanır. Bu testlerin *in vivo* testlerden farkı, test edilen kimyasalın canlıya değil ondan alınan

dokuya dış ortamda uygulanmasıdır. Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa süreli mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri insanda risk tayini için kullanılmaktadır (Young 2002).

İnsan kanında birçok farklı hücre tipi bulunmasına rağmen kromozom veya DNA ile ilgili çalışmalar genellikle çekirdekli lenfosit hücreleri ile yapılmaktadır. Periferik kan kültürü yöntemi olarak bilinen bu yöntem, kısa sürede istenilen sayıda hücrenin incelenebilmesi, kültür süresinin kısa olması ve elde edilen kromozom preparatlarının diğer yöntemlerle elde edilenlerden daha kaliteli olması nedeniyle tercih edilmektedir (Rooney and Czepulkowski 1986; Öztaş 2000; Başaran 2003). Periferik kan kültür yöntemi, bugün başta tıbbi genetik (Chu *et al.* 2006) olmak üzere onkoloji (Eisenthal *et al.* 2006), genetik toksikoloji (Rodeiro *et al.* 2006), biyokimya (Bukowska 2004), hematoloji (Saigo *et al.* 1999), immünoloji ve parazitoloji (Franca-Botelho *et al.* 2006; Hu *et al.* 2006) gibi pek çok tıp ve biyoloji alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yapılan araştırmalar sonucu, bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında bir testin tek başına yeterli olmadığı, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde bir seri test sisteminin kullanılması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır (Houk 1992). Sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri arasında *Allium* testi (Levan 1938), *Salmonella* testi (Ames *et al.* 1975), mikronükleus testi (MN) (Mac Gregor *et al.* 1987), kardeş kromatid değişimi testi (KKD) (Latt *et al.* 1981), tek hücre jel elektroforezi (SCGE) (Fairbairn *et al.* 1995) ve somatik mutasyon ve rekombinasyon testini (SMART) (Graf *et al.* 1984) sıralayabiliriz.

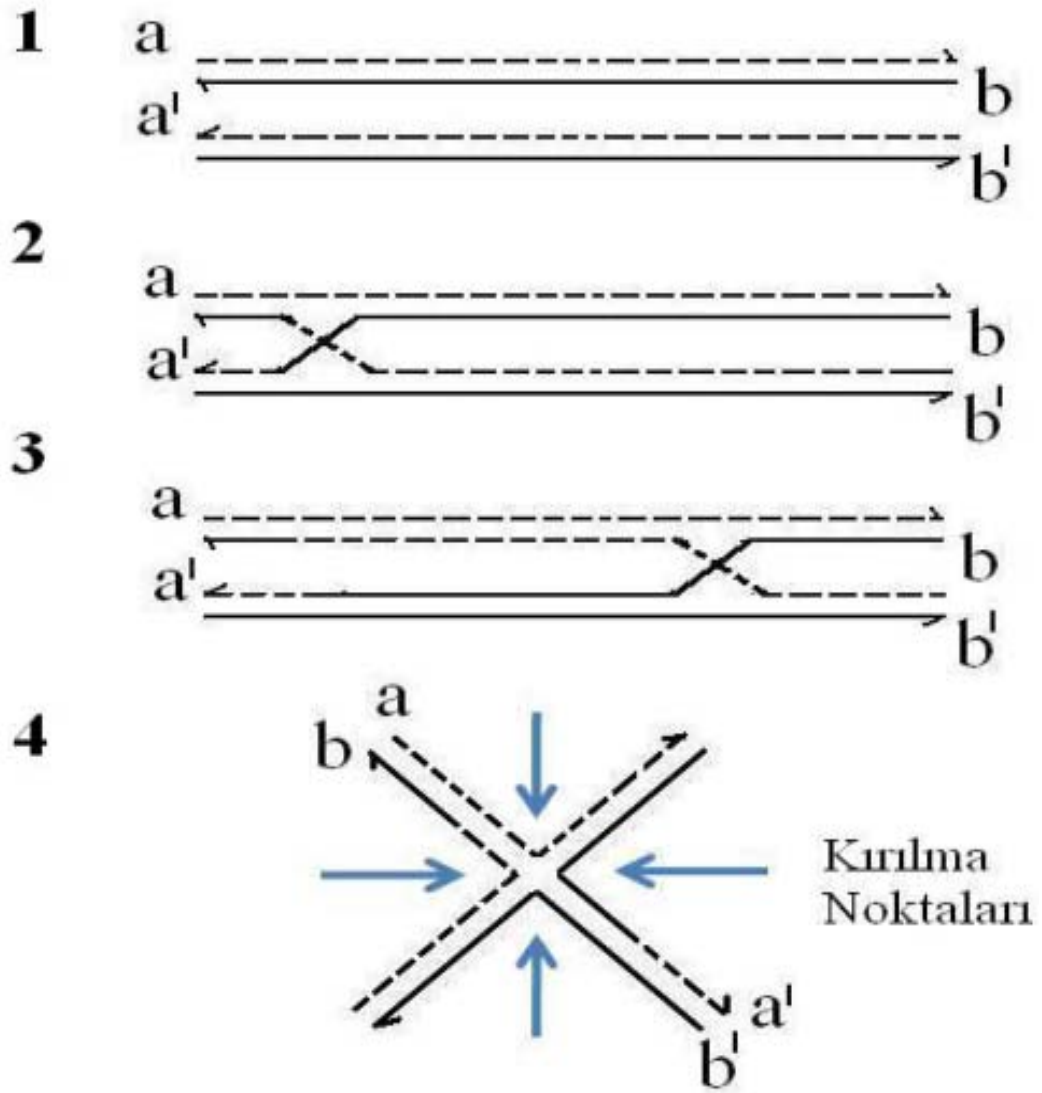
Mikronükleus, kardeş kromatid değişimi ve somatik mutasyon ve rekombinasyon testlerini *in vivo* ve *in vitro* olarak deneylerimizde kullandığımız için, bu bölümde her bir test tekniğine ait tarihçe ve işleyiş mekanizmalarıyla ilgili detaylar verilecektir.

1.7.1.a. Kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

In vitro mutajenik çalışmalar içinde yaygın olarak kullanılan sitogenetik test tekniklerinden birisi kardeş kromatid değişimi (KKD) metodudur. KKD, kromozom morfolojisinde bir değişme olmadan, bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaların karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleşmesi ile oluşmaktadır (Latt *et al.* 1981; Sardaş and Karakaya 1990). Bu kromozomal değişiklik Pery and Thomson (1984)'a göre, ilk kez 1957 yılında Taylor tarafından tanımlanmıştır. Kromozomların radyoaktif timidin (3H-TdR) varlığında bir defa kendilerini eşlemelerine ve sonraki replikasyonda da izotopun yokluğunda kendilerini eşlemelerine izin verilmiştir. Otoradyografik uygulamadan sonra, DNA'nın semikonservatif eşlenmesi sonucunda, her bir kromozomun sadece bir kromatidinin işaretlendiği görülmüştür. Bu işaretleme sonucunda kardeş kromatidler arasında simetrik değişimler gözlenmiş ve bu değişimler "kardeş kromatid değişimi=KKD" (sister chromatid exchange=SCE) olarak adlandırılmıştır.

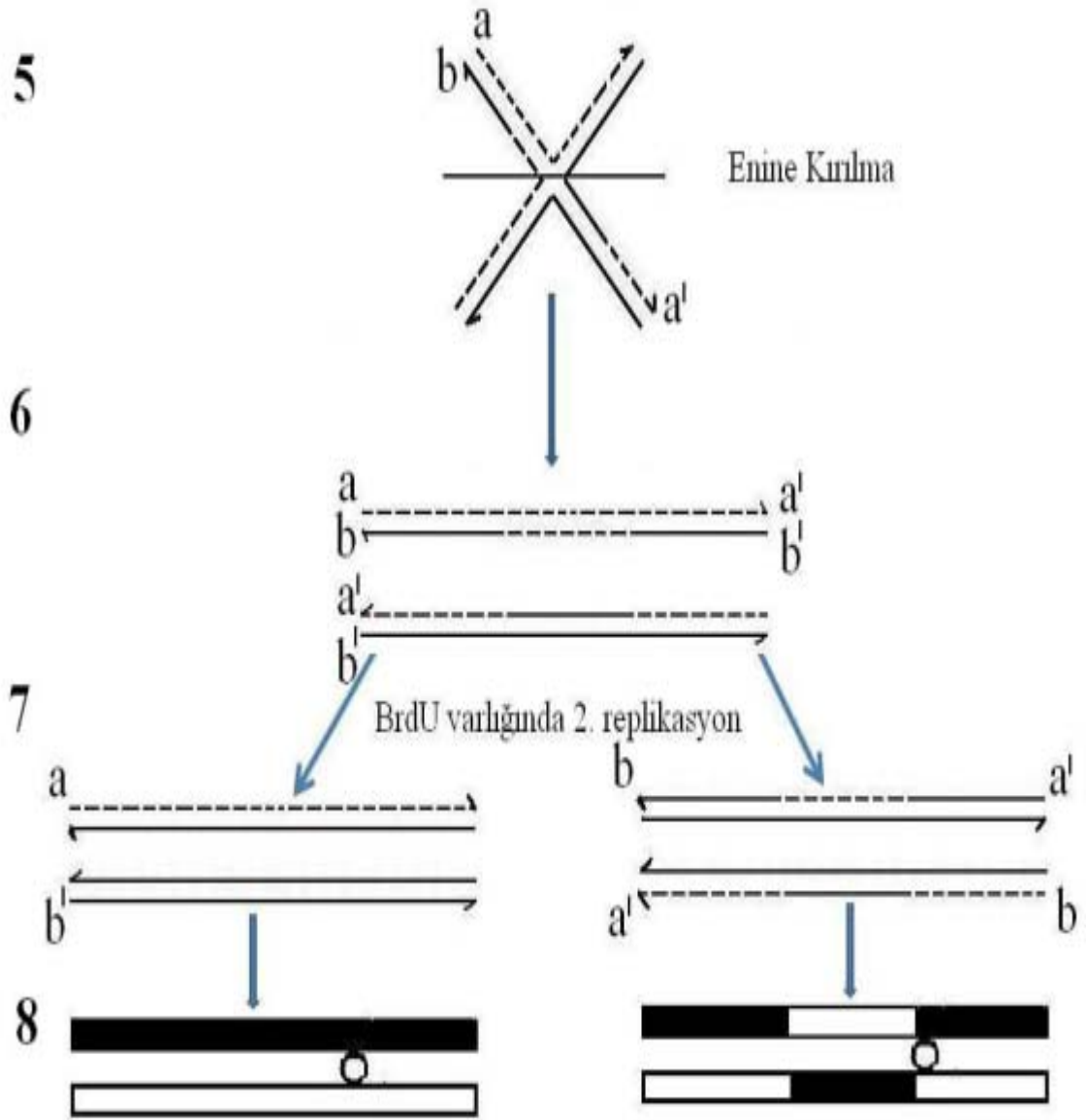
Latt tarafından 1973'te uygulanan yöntemde, timidin analogu olan BrdU (5-bromo-2-deoksiüridin) iki replikasyon döngüsünde bulunacak şekilde kültür ortamına eklenmiştir. BrdU varlığında devam eden DNA sentezi sırasında yeni oluşan DNA'da timin yerine BrdU girer. Böylece her bir kromatid, bir timinli ve bir de BrdU'li DNA zinciri içerir. Mitoz sonrasında her bir kromatid farklı bir kardeş hücreye gider. BrdU'nin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesinin ardından, floresan ışık altında ışınlanıp Giemsa ile boyanarak kardeş kromatidlerdeki kırıklar görünür hale getirilmiştir (Natarajan 2002). Boyama sonrasında, tek bir DNA zincirinde yer değiştirme olmuş kromatid, her iki DNA zincirinde de yer değiştirme olmuş kromatide göre daha parlak floresan verir. Yapılan incelemede, bir kromatid iki tane BrdU içeren DNA zinciri taşıdığı için açık renk, diğeri bir timinli bir de BrdU'li DNA zinciri taşıdığı için koyu renkli gözlenir (Perry and Wolff 1974). Bu şekilde kardeş kromatidlerdeki değişimler belirlenmektedir.

İç veya dış etkenlerin etkisiyle hücre DNA'sındaki değişikliklere bağlı olarak meydana gelen KKD'lerin oluş mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Birçok araştırmacı tarafından değişik modeller öne sürülmüştür. Bu modellerden günümüzde en çok kabul göreni Loveday and Latt (1978) tarafından öne sürülen modeldir (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. KKD oluşum mekanizmasının şematik gösterimi (Loveday and Latt 1978)

- *1-Timin içeren kalıp DNA ve timin yerine BrdU alınarak sentezlenen komplementer DNA,
- 2-Her bir dublekste tek zincir kırığı oluşması ve zincirlerin krosing-over sonucu kardeş DNA dubleksinin zinciri ile birleşmesi,
- 3-Sentezin ilerlemesi ile timin ve BrdU içeren heterodubleks zincirlerin oluşması,
- 4-Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile X formunun meydana gelmesi,



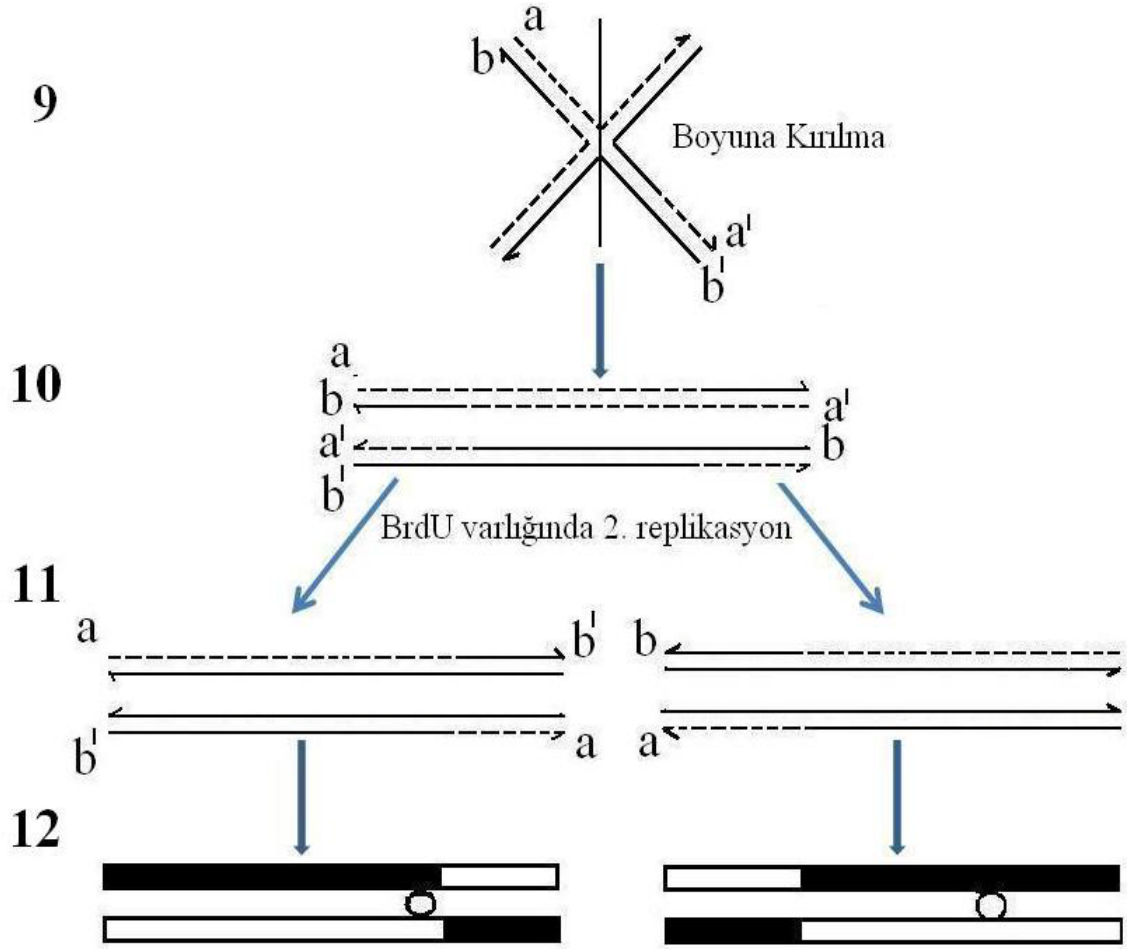
Şekil 1.6. (devam)

*5- Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda enine kırılmanın meydana gelmesi,

6- Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,

7- Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun gerçekleşmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,

8- Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi,



Şekil 1.6. (devam)

*9- Molekülün krosing-over noktası etrafındaki rotasyonu ile oluşan X formunda boyuna kırılmanın meydana gelmesi,

10- Krosing-over noktasında kırılmalarla oluşan kırık parçaların birbirleri ile değil de kardeşlerinin parçaları ile birleştirilmesi sonucu aynı dubleks üzerinde timin, diğerinde BrdU içeren bölgelerin oluşması,

11- Ortamda BrdU mevcutken 2. replikasyonun gerçekleşmesi ve sadece BrdU içeren komplementer zincirlerin sentezlenmesi,

12- Her iki zincirinde BrdU içeren bölgelerin soluk, her iki zincirinde timin veya bir zincirinde BrdU, diğerinde timin içeren bölgelerin koyu boyanması sonucu KKD gözlenmesi.

KKD oluşumu üzerinde etkili olabilen pek çok faktör mevcuttur. Bunlar, kültürler eklenen BrdU miktarı (Rodriquez-Reyes and Morales 2003) ve antikoagülant türü (Tucker *et al.* 1993), inkübasyon sıcaklığı (Carrona and Natarajan 1988), ortamın pH'sı (Tanrıverdi 1991) gibi kültür faktörleri ve viral enfeksiyonlar (Kurvink *et al.* 1978), sigara-alkol kullanımı (Lazutka *et al.* 1992; Tang *et al.* 1999), yaş (Ganguly 1995), cinsiyet (Anderson *et al.* 1986) ve kalıtsal hastalıklar (Aledo *et al.* 1989; Sönmez 1992) gibi biyolojik faktörler olmak üzere başlıca iki grup altında toplanabilirler. Ayrıca ilaç

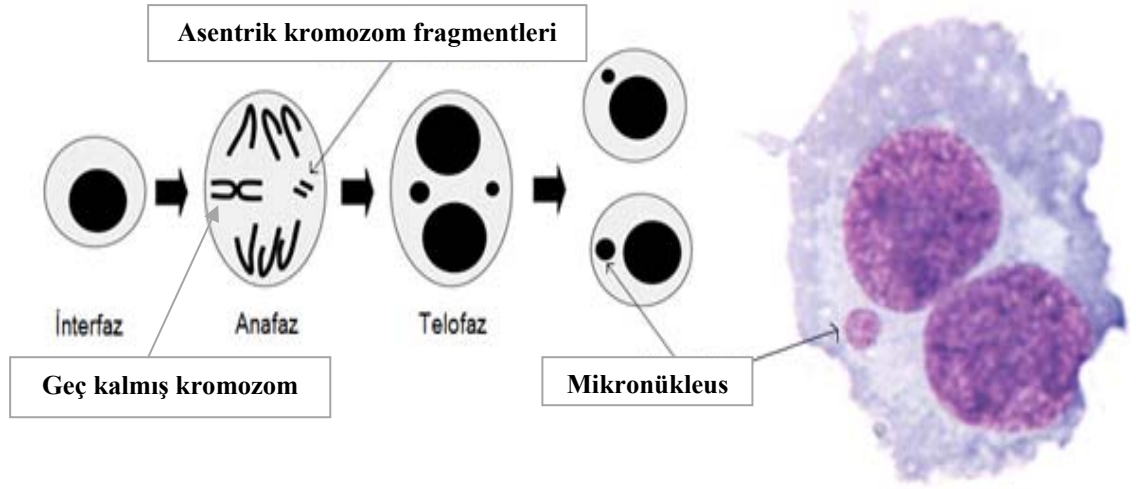
kullanımı, beslenme şekli, fiziksel (UV ve X ışınları) veya kimyasal ajanlara (pestisitler, insektisitler ve petrol ürünleri) maruziyet gibi faktörlerin de KKD frekansını etkileyebildiği belirtilmiştir (Kelsey *et al.* 1990; Baysal *et al.* 2003).

Kimyasal ajanlar sonucu oluşan mutajenitenin ve sitogenetik cevabın gösterilmesinde, sıklıkla KKD testi kullanılmaktadır. KKD testinin uygulandığı birçok çalışma arasındaki tutarlılık bu yöntemi her geçen gün daha geçerli kılmaktadır (Bayel 2006).

1.7.1.b. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus tekniği; çeşitli kimyasal maddelerin ve fiziksel ajanların, memelilerde klastojenik ve anöjenik aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir test tekniğidir (Kirsch-Volders *et al.* 1997; Cicchetti *et al.* 1999). Mikronükleuslar ilk olarak 1886 yılında Howell tarafından anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde gözlenmiştir. 1901’de Jolly yaptığı çalışmalarla mikronükleusun varlığını doğrulamıştır. Bu nedenle mikronükleuslar hematolojide “Howell-Jolly cisimleri” olarak bilinirler (Anwar *et al.* 1994). Fenech (2000)’e göre mikronükleuslar, hücre bölünmesi sırasında anafazda geç kalan kromozom materyalinden veya iğ ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen kromozomlardan meydana gelmektedir. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül etmekte ve böylece ana nükleustan daha küçük yapıda olan mikronükleuslar oluşmaktadır (Şekil 1.7).

Mikronükleus test sistemi, memelilerdeki test sistemleri arasında en ekonomik ve en kısa süreli yöntem olması nedeniyle genetik toksikoloji çalışmalarında çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Emecen ve Ünlü 1995). 1973’te Heddle tarafından mikronükleus yönteminin sıçan kemik iliğine uygulanmasıyla memelilerdeki kromozomal hasarlar belirlenmeye başlanırken ilk kez 1976 yılında Countryman ve Heddle tarafından insan lenfositlerinde uygulanmıştır (Peace and Succop 1999).



Şekil 1.7. MN oluşum mekanizmasının şematik gösterimi (Fenech 1993)

Mikronükleusun değerlendirileceği hücrelerin, uygulama sonrası birinci mitozlarını geçirmiş ve ikinci bir bölünmeye başlamamış olması istenmektedir. Bu da 1985'te Fenech ve Morley tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden biri olan sitokalsin-B adlı aktin polimeraz inhibitörü bir maddenin kültüre eklenerek nükleer bölünmeyi durdurmaksızın, sitoplazma bölünmesini bloke etmesiyle gerçekleştirilmiştir (Fenech and Morley 1985; Falck *et al.* 1997). Bu sayede binükleat hücreler kolaylıkla tespit edilebilmekte ve kültürdeki tek mitoz geçiren hücrelerdeki mikronükleuslar değerlendirilerek tekniğin duyarlılığı büyük ölçüde artırılmıştır (Peace and Succop 1999; Cavallo *et al.* 2005).

KKD testinde olduğu gibi, sigara ve alkol kullanımı (Maffei *et al.* 2002), yaş (Thierens *et al.* 1996), cinsiyet (Barale *et al.* 1998), çeşitli kronik ve enfeksiyonel hastalıklar, yaşam tarzı, ilaçlar ile fiziksel ve kimyasal ajanlara maruziyet (Neri *et al.* 2003; Pelevina *et al.* 2005) gibi faktörler mikronükleus oluşumunu etkilemektedir.

Mikronükleus yöntemi başlıca; lenfositler, eritrositler, kemik iliği, dil, damak, dudakların iç kısmı, idrar kesesi, bronş epitelyumu gibi teknik açıdan mümkün olan tüm dokulara uygulanabilir (Tucker and Preston 1996). Ancak periferik lenfositlerde

mikronükleus uygulaması ile hedef doku toksisitesiyle birlikte total vücut maruziyeti de değerlendirilebilmektedir (Fenech 1993).

1.7.1.c. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

In vivo mutajenite testlerinde deney hayvanlarına mutajenik etkisi araştırılacak madde belli konsantrasyonlarda ve çeşitli yollarla (beslenme, enjeksiyon vb.) verilmektedir. Bu testler genellikle böcek ve memeliler kullanılarak yapılmaktadır. Böceklerle yapılan genotoksikite testlerinden en yaygın olanı genetik yapısı çok iyi bilinen *Drosophila* ile yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'dir.

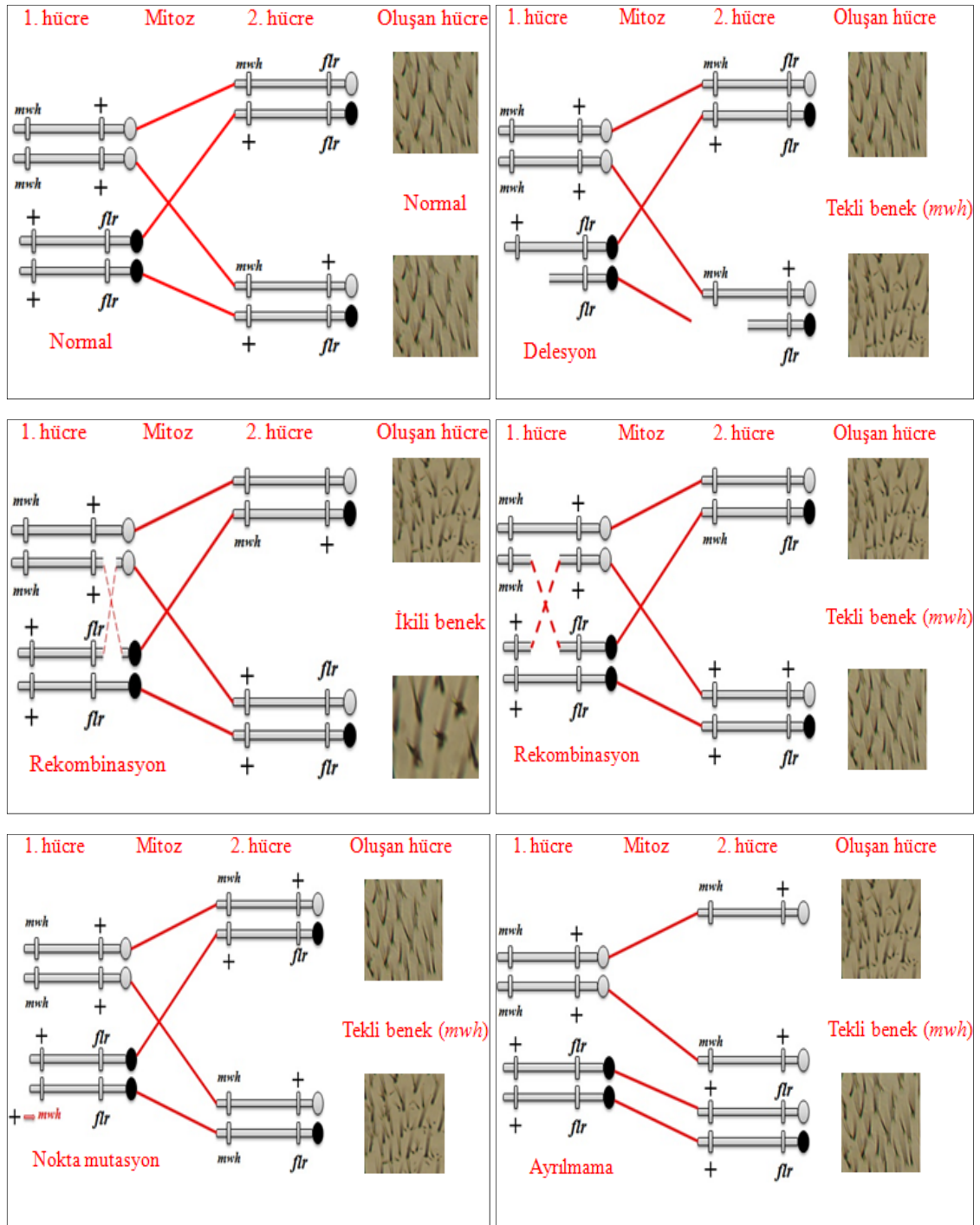
Son yıllarda sıklıkla kullanılan SMART, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin saptanması için oldukça uygun ve etkili bir *in vivo* test sistemidir (Graf *et al.* 1984).

Drosophila, özellikleri yönünden mutajen ve karsinojen maddelerin uygulanma ve izlenmesi açısından uygun bir canlıdır. *Drosophila*; ırklarının küçük yapılı oluşu, kültürünün kolay yapılması, yaşam döngüsünün kısa oluşu, çok sayıda yavru vermesi, az sayıda kromozoma sahip olması, besin gereksinimlerinin basit ve doğadan eldesinin kolay olması nedeniyle genetik çalışmalarda kullanılan ekonomik bir ökaryotik organizmadır.

SMART'ın avantajı, mitotik rekombinasyonların ve mutasyonların etkilerini fenotipte gösterebilmesidir. İşaret genlerinin trans-heterozigot sineklerde bulunması ve kullanılması genotoksik denemede bu özelliklerin gözlenmesi, çalışmanın yöntem olarak kolay ve ucuz bir yol olduğunu göstermektedir. Mutasyon ve karsinojen etkilenme sonucu oluşan ölçümleri yapmak *Drosophila* somatik hücrelerinde, diğer organizmalara göre de kolaydır. Bu test, metot olarak hazırlanan materyalin saklanması ve hazırlanması yönünden üstünlük sağlar. F₁ neslinde mutajenik etkilerin gözlenmesiyle kimyasal maddelerin organizmayı ne oranda etkilediği belirlenebilir.

Drosophila ile yapılan bu *in vivo* test yöntemi, mikroorganizmal *in vitro* ve memeli *in vivo* genotoksisite test sistemleri arasında bağlantı oluşturabilir (Frei and Würgler 1996). SMART, nokta mutasyonu, delesyon, translokasyon, mitotik rekombinasyon ve kromozom kaybı veya ayrılmama gibi, belirli kromozom aberasyonlarının genetik sonuçlarının geniş yelpazesinin saptanmasına izin verir (Graf *et al.* 1984, Graf *et al.* 1996, Graf *et al.* 1998).

SMART, göz ve kanat benek testi olmak üzere iki çeşittir. Her ikisi de erken embriyonik gelişim sırasında hücre gruplarının (imajinal disk) ayrılması esasına dayanmaktadır. Bunlar, larval gelişimleri esnasında yetişkin sineğin vücut yapısına farklılaşmaya kadar, mitotik olarak çoğalırlar (Graf *et al.* 1996, Graf *et al.* 1998). Somatik sistem çok sayıda avantaj sunmaktadır. Testi yapabilmek için sadece bir generasyon gereklidir. Kanat ve göz gibi iki iyi bilinen somatik doku tek bir sinekte çok sayıda hücrenin (bir kanatta yaklaşık 25 000 hücre, bir gözde de yaklaşık 800 ommatidium) analizine izin verir. Bu hücrelerin sayımı kolay ve hücre belirleyicileri güvenilirdir (Graf and Würgler 1996). Yaklaşık 30 yıl önce kanat hücre belirleyicileri *multiple wing hair (mwh)*, ve *flare (flr³)*'in kullanımı geliştirilmiştir (Graf *et al.* 1984). Kanat benek testinde, beneklerin farklı tipleri farklı genetik mekanizmalar nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Tekli benekler, nokta mutasyon, delesyon ve iki işaret geni (*mwh* ve *flr³*) arasındaki mitotik rekombinasyonla oluşurken, ikili benekler 3. kromozomun sentromeri ve *flr³* geni arasındaki somatik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Somatik mutasyon ve rekombinasyonların oluşum mekanizmalarının şematik gösterimi

GKM'ler her ne kadar mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet ve koku gibi duyuşal özellikleri düzeltme gibi amaçlar doğrultusunda kullanılıyorsa da

bu maddeler gelişigüzel, tüzük dışı ve sürekli olarak özellikle duyarlı risk grupları tarafından kullanıldıklarında egzama, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, ishal, bulantı, kusma, rinit, hiperaktivite, aşırı duyarlılık gibi çeşitli rahatsızlıklara yol açmaktadırlar (Adams and Mahan 1984; Arslan 2004; Saldamlı ve Uygun 2005). Tüketilen gıdalarla birlikte her gün çeşitli katkı maddelerinin vücut içerisine girdiği düşünöldüğönde, sağlığa zarar vermeyecek dozda kullanılsalar dahi, bu maddelerin bir süre sonra vücut içerisinde birikerek insan sağlığı için tehlikeli olabilecek miktarlara ulaşabilecekleri ve dokularda çeşitli hasarlar meydana getirebilecekleri göz ardı edilmemelidir (Sarıkaya ve Solak 2003).

Bugün gıda, ilaç, kozmetik, tarım ve endüstride kullanılan her kimyasal maddenin insan sağlığı ve çevreye olan etkisi başta Dünya Sağlık Örgütü olmak üzere birçok ulusal sağlık kuruluşu tarafından ayrıntılı olarak incelenmekte, insan sağlığı ve çevre üzerinde kabul edilemez ölçüde risk taşıyanların kullanımına izin verilmemektedir (Yurttagöl 1993; Karakaya 2011). Bununla birlikte kullanılmasına izin verilen GKM'nin sürekli olarak alındığın zaman toksik etkiler gösterdikleri de bir gerçektir.

Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, *in vitro* ortamda insan lenfosit kültüröyle yapılan kısa süreli genotoksisite testlerinden kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronökleus (MN) testleri ile *in vivo* ortamda *D. melanogaster* ile yapılan SMART yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan parabenlerin olası genotoksik etkilerinin, kültöre alınmış insan periferal lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronökleus (MN) testi ve *D. melanogaster*'de SMART olmak üzere *in vivo* ve *in vitro* yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Matthews *et al.* (1956) fare, sıçan ve köpeklerle yaptıkları akut ve kronik toksisite çalışmaları sonucunda parabenlerin çok düşük oranda toksisite gösterdiklerini ve gıdalarda koruyucu madde olarak güvenli bir şekilde kullanılabileceklerini belirtmişlerdir.

Ishidate and Odashima (1977) içinde gıda katkı maddelerinin de bulunduğu 134 farklı kimyasal maddenin genotoksik etkisini Çin hamster fibroblast hücrelerinde araştırmış ve bunlardan potasyum benzoat ve sodyum benzoatın kromozom aberasyonu testinde pozitif sonuç verdiğini bulmuşlardır.

Tohda *et al.* (1980) benzoik asitin insan kanı lenfosit hücrelerinde 30mM'lık konsantrasyonda sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Hasegawa *et al.* (1984) sorbik asit ve onların sodyum ve potasyum tuzlarının Çin hamster V79 hücrelerinde kardeş kromatid değişimi, kromozomal anormallik ve gen mutasyon frekanslarını arttırdığını bulmuşlardır.

Ishidate *et al.* (1984) benzoik asitin genotoksik etkilerini *Salmonella*/mikrozom testi ve *in vitro* Çin hamster fibroblast hücrelerini kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda, benzoik asitin her iki testte de zayıf genotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çin hamster V79 hücrelerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda, sodyum nitritin negatif genotoksik etkili olduğu gözlenmiştir (Budayova 1985).

Sodyum nitritin 265 ve 530µg/mL'lik dozları ile yapılan *in vitro* testlerde, bu maddenin BSC-1 ve HeLa hücrelerinde kromozomal anormallik frekansını önemli oranda artırdığı belirlenmiştir (Luca *et al.* 1987).

Zeiger *et al.* (1987) benzoik asitin *Salmonella typhimurium*'un TA97, 98, 100, 1535 ve 1537'lik suşlarında 5000µg/petri konsantrasyonu üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Mukherjee *et al.* (1988) sorbik asitin kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekansını sadece yüksek konsantrasyonlarda, sodyum nitritin ise tüm konsantrasyonlarda arttırdığını saptamışlardır.

Munzner *et al.* (1990) potasyum sorbat ve sodyum sorbatın genotoksik etkisini ames testi, Çin hamster ovaryum hücrelerinde HGPRT (hipoksantin guanin fosforibozil transferaz) ve sıçanlarda kardeş kromatid değişim testi ile yine Çin hamster kemik iliği hücrelerinde mikronükleus testlerini kullanarak araştırmışlardır. Her iki kimyasal maddenin de *in vitro* testlerde herhangi bir genotoksik etki göstermediğini, *in vivo* testlerde ise bu maddelerin taze hazırlanmış eriyiklerinin hiçbir klastojenik etki göstermemesine rağmen, bekletilmiş eriyiklerde klastojenik etkilerinin varlığını tespit etmişlerdir.

Schlatter *et al.* (1992) koruyucu katkı maddelerinden potasyum sorbat, sodyum sorbat ve 4,5-epoksi-2-heksenoik asitin olası genotoksik etkilerini somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırdıkları çalışma sonucunda, sadece 4,5-epoksi-2-heksenoik asitin zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu, potasyum sorbat ve sodyum sorbatın ise genotoksik etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Meng and Zhang (1994) sodyum bisülfitin insan lenfosit hücrelerinde kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus oluşumunu artırdığını bulmuşlardır.

Drosophila melanogaster ile yapılan çalışma sonucunda, koruyucu katkı maddelerinden metil üreanın genotoksik etki göstermediği, sodyum nitritin ise 36mM konsantrasyonda zayıf genotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte metil ürea ve sodyum

nitritin birlikte uygulanması sonucunda genotoksik etkinin önemli derecede arttığı belirtilmiştir (Guzman-Rincon *et al.* 1998).

Parabenlerin bir dizi östrojenik aktiviteye sahip olduğu ilk olarak sıçanlarda, Routledge *et al.* (1998) tarafından rapor edilmiştir.

Ferrand *et al.* (2000) gıda katkı maddelerinden sorbik asit ve potasyum sorbatın HeLa hücreleri ve plazmid DNA'larında mutajenik ve genotoksik etkisinin olmadığını bulmuşlardır.

Parabenlerin östrojenik aktivitesi ile ilgili olarak yapılan *in vitro* çalışmalarda parabenlerin östrojen reseptörlerine bağlandığı ve bu reseptörlerle kontrol edilen genleri aktive ettiği gösterilmiştir (Okubo *et al.* 2001).

Rencüzoğulları *et al.* (2001) sodyum metabisüfitin *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde mitotik anormallikleri artırdığını ve mitotik indeksi düşürdüğünü saptamışlardır.

Propilparaben ve bütılparaben ile yapılan çalışmalar sonucunda bu maddelerin genç erkek sıçanlarda düşük epididim ve seminal vezikül ağırlığına, düşük sperm üretimi ve testosteron düzeyi gibi olumsuz üreme etkilerine neden olabileceği belirtilmiştir (Oishi 2001, 2002).

39 farklı gıda katkı maddesinin genotoksik etkisinin araştırıldığı bir başka çalışma sonucunda; 7 gıda boyasının (amarant, allura kırmızısı, kokkin, tartrazin, eritrosin, floksin ve rose bengal), 2 antioksidan gıda katkı maddesinin (bütillenmiş hidroksianisol ve bütillenmiş hidroksitoluen), 3 fungusitin (bifenil, sodyum fenilfenol ve tiyabendazol) ve 4 gıda tatlandırıcısının (sodyum siklamat, sakkarin, sodyum sakkarin ve sukloroz) farelerin sindirim sistemi organlarında DNA hasarı meydana getirerek genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Sasaki *et al.* 2002).

Aktaç *et al.* (2003) yaptıkları bir çalışmada sitrik asit ve benzoik asitin fare karaciğeri üzerine toksik etkilerini incelemişlerdir. 10 gün süre ile bu maddelerin uygulanmasıyla tüm deney gruplarında karaciğerde kromatin yıkımı, vakuollü ve camsı sitoplazmalı hepatositler, hepatositler içerisinde kollajen fibrillerde artış şeklinde nekrotik değişikliklere rastlamışlardır. Ayrıca karaciğer enzimlerinden biri olan ürikazın aktivitesi kontrole göre tüm gruplarda artarken, katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artış gözlenmemiştir.

Parabenlerde, östrojenik aktivitenin ester yan zincirinin büyüklüğüne paralel olarak arttığı ve en düşük aktivitenin metilparaben, en yüksek aktivitenin ise izobütilparabende olduğu görülmüştür (Darbre *et al.* 2003).

Sarıkaya ve Solak (2003) *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile benzoik asidin olası genotoksik etkilerini incelemişlerdir. Araştırma sonucunda, bu maddenin tüm dozlarda (50, 75 ve 100mM) *Drosophila*'da mutasyona sebep olduğu, ayrıca yaşam süresini kontrole göre önemli ölçüde kısalttığı bildirilmiştir.

Borroto *et al.* (2003) antimikrobiyal ajan olarak kullanılan 2-furil-1-nitroetan ile yaptıkları çalışmada bu koruyucu katkı maddesinin farelerde mikronükleus oluşumunu indüklediğini belirtmişlerdir.

Avrupa Gıda Güvenliği Resmi Otoritesi'nin (The European Food Safety Authority=EFSA) 2004 yılında yapmış olduğu risk değerlendirmesinde, metilparabenle yapılan yeni çalışmalarda tavşanda günlük 300mg/kg vücut ağırlığı dozunun ve kemiricilerde 550mg/kg vücut ağırlığı dozunun fetüs üzerinde herhangi bir toksisiteye yol açmadığı bildirilmiştir.

Bitkiler aleminde p-hidroksibenzoik asit (paraben) ve türevlerinin arpa, çilek, siyah üzüm, şeftali, havuç, soğan, mango gibi bitkilerde de doğal olarak bulunduğu bilinmektedir (Viitanen *et al.* 2004).

Borik asitin 600, 800 ve 1000µg/mL’lik konsantrasyonlarda insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatid değişimi ve poliploidi gibi anormalliklere neden olduğu ve kromozomal anormallik frekansını doza bağlı olarak artırdığı tespit edilmiştir (Arslan 2004).

Avrupa Komisyonu Tüketici Ürünleri Bilimsel Komitesi’nin (Ec Scientific Committee On Consumer Products) 2005 yılı risk değerlendirmesinde sıçanlar, köpekler ve fareler üzerinde yapılmış akut, subakut ve kronik toksisite çalışmalarına göre parabenlerin toksik, karsinojenik, genotoksik ve teratojenik olmadığı ve tüm parabenler için günlük alım miktarı (ADI) değerinin 10mg/kg olduğu kabul edilmiştir. Bu değerlendirmede parabenlerin dokularda birikmediği ve ester bağının kırılarak yoğun bir biçimde metabolize olduğu bildirilmiştir.

Koçak (2005) sitrik asitin *in vivo* genotoksik etkisini *Tinca tinca* (Pisces: Cyprinidae) eritrositlerinde mikronükleus testi ile araştırmıştır. Araştırmacı sitrik asitin 200, 300 ve 400µg/mL’lik dozlarını kullanmış ve uygulama gruplarının tamamında mikronükleus oluşumunun kontrole göre önemli oranda arttığını belirlemiştir.

Sarıkaya and Çakır (2005) sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitratın genotoksik etkilerini *Drosophila*’da somatik mutasyon ve rekombinasyon testini kullanarak araştırmışlardır. Araştırma sonucunda, çalışılan dört katkı maddesinin de 50, 75 ve 100mM’lık konsantrasyonlarda genotoksik etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal gıda katkı maddesi olan bifenilin, insan lenfositlerinde yapısal anormalliklerin oluşumunu indüklerken, sayısal anormalliklerin oluşumuna herhangi bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Parlak 2007).

Blaszczyk and Skolimowski (2007) antioksidan gıda katkı maddesi olarak kullanılan etoksiguinin, 1-250µM uygulama gruplarında DNA hasarını kontrole göre önemli oranda artırdığını belirlemişlerdir.

Yapılan bir başka araştırmada borik asit, sitrik asit, potasyum sitrat, sodyum benzoat ve sodyum sitratın genotoksik etkileri *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde incelenmiştir. Çalışılan katkı maddelerinin tümü mitotik bölünmeyi azaltırken anormal hücre frekansını doza bağlı olarak artırmıştır. Katkı maddeleri anafaz köprülerine, C-mitoza, geri kalmış kromozomlara, mikronükleus oluşumuna ve çeşitli kromozom kırıkları ile yapışkan uçlara neden olmuştur (Türkoğlu 2007).

Kayraldız and Topaktaş (2007) sıçan kemik iliği hücrelerinde sodyum metabisülfitin olası genotoksik etkisini araştırdıkları çalışma sonucunda, bu koruyucu katkı maddesinin kromozom ve kromatid tipi kırılmalara, kardeş kromatid değişimlerine ve fragment oluşumuna neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Sircar *et al.* (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, havuç köklerinde 800µg/g kadar paraben olduğu bulunmuştur. Bu bulgulardan yola çıkılarak parabenlerin bitkilerde bakteriyel veya mantar enfeksiyonlarına karşı ortak bir savunma ürünü olarak fonksiyon gösterdiği bildirilmiştir.

Anderson (2008) etilparaben ve metilparabenin Çin hamster yumurtalık hücrelerinde kromozomal aberasyonları artırmasına karşın genel olarak mutajen olmadığını ifade etmiştir. Aynı yazar parabenlerin alerjik bünyeli kişiler dışında herhangi bir yan etkisinin olmadığını da vurgulamıştır.

Parabenlerle yapılan bir araştırma sonucunda, tüm paraben türlerinin östrojenik aktiviteye sahip oldukları ancak bu aktivitenin doğal bir östrojen olan 17β-estradiolün aktivitesinden 1000 ila 1000 000 katı kadar daha düşük olduğu bildirilmiştir (Van Meeuwen *et al.* 2008).

Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitratın insan periferik kan hücrelerinde hiçbir sitotoksik etki göstermediği sadece potasyum sorbat ve sodyum benzoatın yüksek

konsantrasyonlarda zayıf sitostatik ve genotoksik etki gösterdiği belirtilmiştir (Mpountoukas *et al.* 2008).

Rencüzoğulları *et al.* (2008) antimikrobiyal bir madde olan bifenilin, insan lenfositlerinde hem kromozom hem de kromatid tipi yapısal anormalliklere sebep olduğunu ve kromozomal anormalliklerin frekansını kontrol grubuna göre tüm dozlarda (10, 30, 50 ve 70µg/mL) önemli oranda artırdığını belirlemişlerdir.

Sodyum propiyonat, potasyum propiyonat ve kalsiyum propiyonatın genotoksik etkilerinin *Allium cepa* hücrelerinde incelendiği bir başka çalışma sonucunda, tüm bu katkı maddelerinin kromozomal anormalliklerin frekansını artırdığı ve mitotik indeksi düşürdüğü belirlenmiştir (Türkoğlu 2008).

Yavuz-Kocaman *et al.* (2008) antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfitin insan lenfositlerinde 25, 50, 100 ve 200µg/mL'lik konsantrasyonlarda kromozomal anormalliklerin frekansını kontrol grubuna göre önemli düzeyde artırdığını belirtmişlerdir.

Yılmaz (2008) gıdalarda sıklıkla kullanılan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın *in vitro* genotoksik etkilerini insan periferik lenfositlerinde araştırmış ve çalışılan katkı maddelerinin tümünün kromozomal anormallik, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekanslarını kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırdığını tespit etmiştir.

Yılmaz *et al.* (2008) gıdalarda antioksidan katkı maddesi olarak kullanılan sitrik asit ve benzoik asitin genotoksik etkilerini *Allium sativum* kök ucu hücrelerinde araştırmışlardır. Sitrik asite maruz kalan *A. sativum* kök ucu hücrelerinde mitotik indekste kontrole göre bir azalma gözlenirken birçok kromozomal anormalliklere sebep olduğu da tespit edilmiştir. Bununla birlikte benzoik asitin de *A. sativum* kök

hücrelerinde kromozom aberasyonlarını artırıp mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir.

Metilparabenin *D. melanogaster*'de gelişim ve yumurta verimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada %2'lik metilparaben konsantrasyonunun toksik etki gösterdiği, yumurta, larva, pupa ve erginleşebilen birey sayılarını önemli oranda düşürdüğü belirlenirken aynı çalışmada metilparabenin %0,02'lik düşük konsantrasyonunda bu sonuçların tersine östrojenik aktivite göstererek bu oranları artırdığı vurgulanmıştır (Wei 2009).

Parabenlerin bitkilerde olduğu gibi bakterilerde, böceklerde, arı sütünde ve dişi köpeklerin vajinal salgılarında da doğal olarak bulunduğu yapılan araştırmalarla belirlenmiştir (Dweck 2011).

Aubert *et al.* (2012) Sprague-Dawley sıçanları ile yaptıkları çalışma sonucunda metilparaben, propilparaben ve bütilparabenin ağız, deri ve deri altı gibi çeşitli yollarla yapılan uygulamalarla memeli organizmalar üzerinde zararlı bir etki verecek oranda plazmada birikmediği, emilimlerinin çok iyi olduğu ve tamamen zararsız küçük metabolitlere parçalandıkları sonucuna varılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışmada, parabenlerin omurgalı ve omurgasız olmak üzere iki farklı organizmanın somatik hücreleri üzerinde olası genotoksik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve kültüre alınmış insan periferik lenfosit hücrelerinde kardeş kromatid değişimi (KKD) ile mikronükleus (MN) testleri kullanılmıştır.

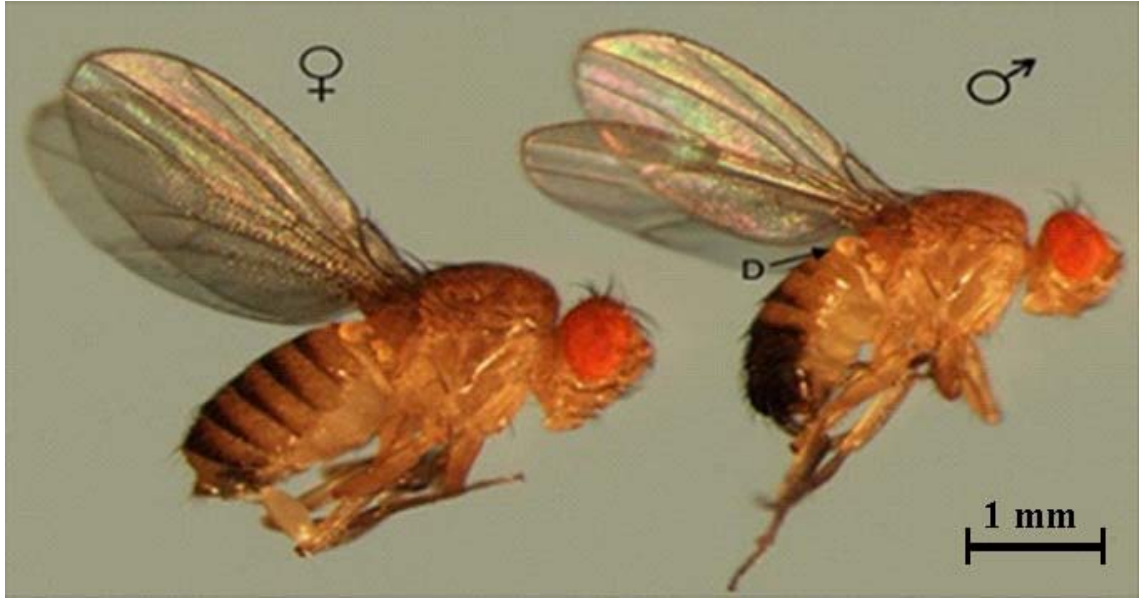
3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan organizma

Çalışmamızın ilk bölümünde parabenlerin olası genotoksik etkileri SMART ile *Drosophila melanogaster*'de araştırılmıştır. *D. melanogaster*, çürümüş meyvelerin üzerinde beslenip üreyen yaklaşık 3-4mm uzunluğunda Diptera takımına ait yabani tip (wild type = w.t.) bir sinek türüdür (Şekil 3.1). Larvaları genellikle fermente meyveler üzerinde geliştiğinden “sirke sineği” veya “meyve sineği” olarak da tanınan bu tür, ilk kez 1910 yılında Thomas Morgan tarafından genetik araştırmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Bugün ise özellikle genotoksisite çalışmalarında en sık kullanılan ökaryotik model organizma haline almıştır.

Bu çalışmada, *D. melanogaster*'in *mwh* ve *flr*³ soyları kullanılmıştır. Bu hatlar Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilmiş ve bölümümüz Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda standart Lewis besin ortamında (Lewis and Bacher 1968) (Çizelge 3.1), *Drosophila* için ideal yaşama koşullarında (25±1°C ve %60 bağıl nem) kültüre alınmıştır. Normal metabolik aktiviteye sahip bu türlerin genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley and Zimm 1992).

- *mwh* / *mwh*
- *flr*³ / *In (3LR)TM3, BdS*



Şekil 3.1. *D. melanogaster*'in Oregon R soyu (yabanıl tip) erkek ve dişi bireyleri D: Denge organı

Çizelge 3.1. *Drosophila* Lewis besin ortamının içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Agar agar	9g
Toz şeker	60g
Bira mayası	19g
Mısır unu	50g
Propionik asit	3,5mL
Saf su	565mL

3.1.1.a. *Drosophila melanogaster*'in sistematığı

Alem: Animalia (=Hayvanlar alemi)

Şube: Arthropoda (=Eklem bacaklılar). Kitinden yapılmış bir dış iskeletleri vardır ve üyeleri eklemlidir.

Alt şube: Mandibulata-Antennata. Bu alt şubeye dahil olan hayvanlar antenli olup mandibulları iyi gelişmiş ve kuvvetlidir. İç kısmında sert dişler bulunur.

Sınıf: Insecta-Hexapoda (=Böcekler- Altı bacaklılar). Vücut; baş, gövde ve abdomen olmak üzere üç kısma ayrılır. Toraks bölgesinin üç segmentli olması ve her göğüs segmentinde bir çift bacağın bulunması ile tanınırlar. İkinci (mesotoraks) ve üçüncü (metatoraks) göğüs segmentlerinden birer çift kanat çıkar. Başta bir çift anten ve bir çift bileşik göz bulunur.

Alt sınıf: Pterygota (=Kanatlı böcekler). Meso ve metatoraksta hareketli kanatlar taşırlar.

Üst takım: Mecopteroidea-Panorpoidea (=Uzun kanatlılar). Arka kanatları körelme eğilimi gösterir.

Takım: Diptera (=İki kanatlılar). Göğüs bölgesinden bir çift kanat çıkar. Metatorakstaki ikinci çift kanatlar halter adı verilen topuz şeklinde bir denge organına dönüşmüştür.

Alt takım: Brachycera (=Sinekler-Kısa antenliler). Larvada ağız çengelleri bulunur. Pupa, üçüncü larva evresinden kalma bir deri ile sarılır. Antenleri çok kısadır ve birbirinden farklı şekilleri olan segmentlerin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Üçüncü anten segmenti ya sadece uç kılı taşır (arista) ya da bu segmenti izleyen anten segmentleri birbiriyle kaynaşarak kamçı oluşturur.

Familiya: Drosophilidae (=Sirke sinekleri-Meyve sinekleri). Çürümekte olan meyvelerin ve bazı tatlı sıvıların (meyve suyu, şarap, sirke, bira v.s) kokusuna pozitif kemotaksi gösterirler. Ayrıca, bitki öz suları, dışkılar ve mantarlar içinde de gelişebilirler.

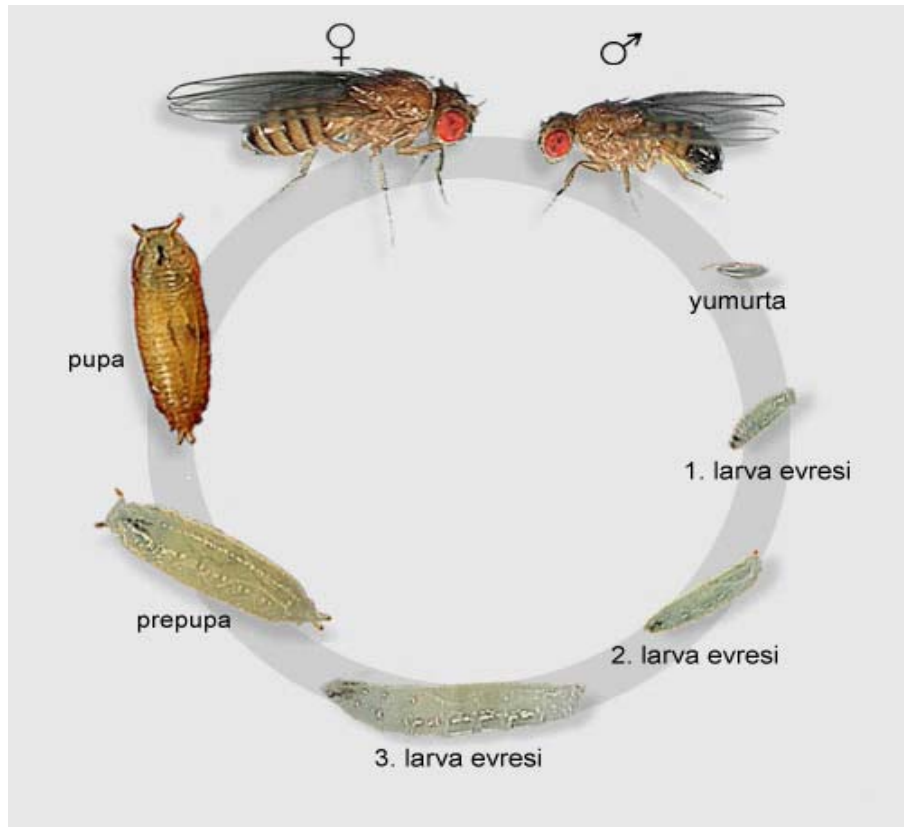
Cins: *Drosophila*. Oldukça küçüktürler. Ev sineğinin 1/3'ü kadardırlar.

Tür: *Drosophila melanogaster*

3.1.1.b. *Drosophila melanogaster*'in hayat döngüsü

D. melanogaster'de gelişim tam başkalaşım (holometabol) şeklindedir. Ergin olmadan önce *D. melanogaster* embriyosu sırasıyla üç larva, prepupa ve pupa evrelerini geçirir. Döllenmeden yaklaşık 22-24 saat sonra yumurtadan larva (1. larva evresi) çıkar. İki deri değişiminden sonra (2. ve 3. larva evreleri) önce prepupa daha sonra pupa meydana

gelir (Şekil 3.2). Yumurtadan ergin bireyin oluşması için geçen süre, yaklaşık 9-10 gündür. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü ve ömür uzunluğu sıcaklık (Sorensen and Loeschcke 2002; Sinclair and Roberts 2005; Ayar *et al.* 2009, 2012), beslenme (David *et al.* 1975; Fred and Timothy 1997; Aşkın *et al.* 2007), popülasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon, nem (Clark and Rockstein 1964; Ünlü and Bozcuk 1979) gibi faktörler tarafından farklı şekilde etkilenmektedir.



Şekil 3.2. *D. melanogaster*'in hayat döngüsü (Anonymous 2012a)

3.1.2. *In vitro* çalışmalar için donör seçimi ve kan örneklerinin alınması

Çalışmamızın ikinci bölümünde *in vitro* test tekniklerinden insan kanı lenfosit hücrelerinde yapılan kardeş kromatid değişimi (KKD) testi ve mikronükleus (MN) testi kullanılmıştır. *In vitro* olarak yapılan çalışmaların tümünde materyal olarak sigara ve alkol kullanmayan, yakın zamanda enfeksiyon hastalığı geçirmemiş, X ışını gibi

herhangi bir fiziksel ajana maruz kalmamış, 23-25 yaşlarında sağlıklı erkek ve kadınlardan alınan periferik kan kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmamızda olası genotoksik etkilerini araştırdığımız parabenler (metilparaben, propilparaben, etilparaben ve bütılparaben) Sigma-Aldrich şirketinden temin edilmiştir. Ayrıca araştırmamızda kullandığımız kimyasal maddeler, Çizelge 3.2’de toplu halde verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kullanılan kimyasal maddeler

TEST TEKNİĞİ	KİMYASAL MADDE	FİRMA ADI
SMART	<i>Drosophila</i> besiyeri	Carolina Bio. Supp.
	Agar agar	Merck
	Dietil eter	Merck
	Propionik asit	Merck
	Gliserol	Merck
	Kloral hidrat	Merck
	Arap zımkı	Sigma
	Etil metansülfonat	Sigma
	Sodyum hidroksit	Merck
	Entellan	Merck
KKD ve MN	Kromozom medyumı (Çizelge 3.3)	Biochrom
	Kolşisin	Gibco
	Potasyum klorür	Merck
	Glasiyal asetik asit	Sigma
	Sodyum klorür	Merck
	Metanol	Sigma
	5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU)	Sigma
	Sodyum hidrojen fosfat	Fluka
	Potasyum dihidrojen fosfat	Fluka
	Sodyum sitrat	Merck
	Sitokalazin B	Sigma
	Giemsa boyası	Merck
	Hoechst 33258 boyası	Sigma
	İmmersion yağı	Merck

Çizelge 3.3. Kromozom medyumunun her 100ml'sinde bulunan madde ve miktarları

MADDE	MADDE MİKTARI
Minimum Esansiyel Medyum (MEM)	85mL
Fetal Bovine Serum (FBS)	15mL
Heparin	2500U
Penisilin G (sodyum tuzu)	7500U
Streptomisin sülfat	5mg
Fitohemaglutinin L	0,25mg
Askorbik asit	0,50mg
Glutasyon redüktaz	0,50mg

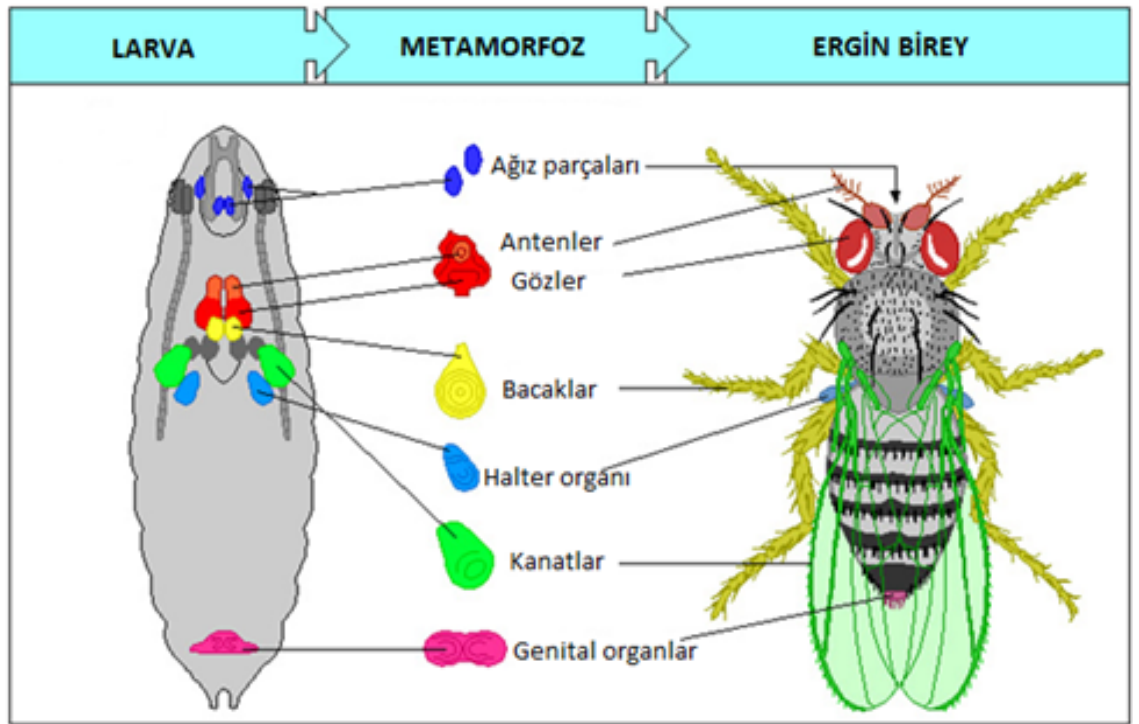
3.2. Yöntem

3.2.1. *In vivo* somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)

Model organizma olarak *Drosophila*'nın kullanıldığı testler arasında son yıllarda oldukça popüler olan testlerden birisi de, nokta mutasyon, delesyon, kromozom bozukluğu ve mitotik rekombinasyonun tespit edilmesine olanak sağlayan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'dir. SMART diğer testlerle karşılaştırıldığında, daha hızlı, güvenilir ve ekonomik olması nedeniyle oldukça avantajlıdır. Ayrıca SMART, kimyasal maddelerin somatik hücrelerde oluşturduğu mutasyonun genetik olarak ölçülmesinde daha doğru sonuçlar vermesi bakımından da oldukça üstün bir yöntemdir.

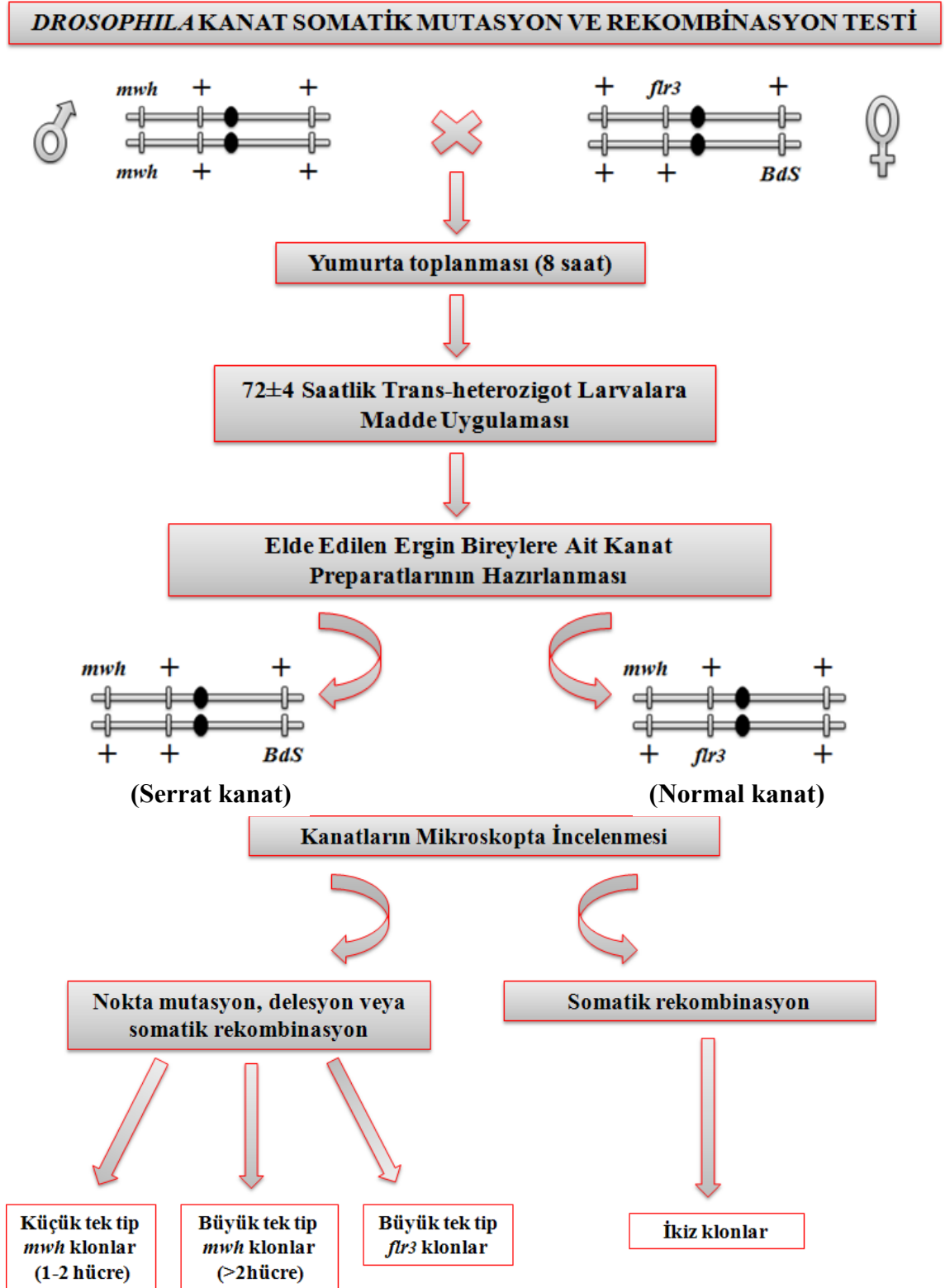
Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi, göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere iki çeşittir. Bu testler, hücre gruplarının düzenlendiği ilk embriyonik gelişim dönemini temel almaktadır. Uygun işaret genlerinin heterozigotluğunun kaybını temel alarak geliştirilmiş olan bu testler, larvanın imajinal disklerinde mitotik olarak çoğalan büyük hücre gruplarını hedef alır. İmajinal diskler, larval gelişim sırasında mitozla

çoğalır ve metamorfoz ile ergin bireyin kanat, göz, bacak gibi farklı vücut yapılarını oluşturur (Şekil 3.3). Eğer bu imajinal disk hücrelerinin herhangi birinde genetik bir değişiklik olursa, bundan sonraki oğul hücrelere de bu değişiklik aktarılarak mutant hücre grupları (klonlar) oluşur. Bu genetik değişiklik fenotipte gözlenebilen bir değişikliğe neden olursa, klonlar ergin sineğin kanatlarında ve gözlerinde mutant hücre benekleri olarak ortaya çıkar. Kimyasal maddelere maruz bırakılan sineklerde indüklenmiş klonların toplam sayısı, uygulanan kimyasalın toplam genotoksik aktivitesi ile ilgili sayısal sonuçlar verirken, klonların tipi, klon oluşumunda rol oynayan mutasyonel mekanizmaları ortaya çıkarır (Graf *et al.* 1984; Guzman-Rincon and Graf 1995).



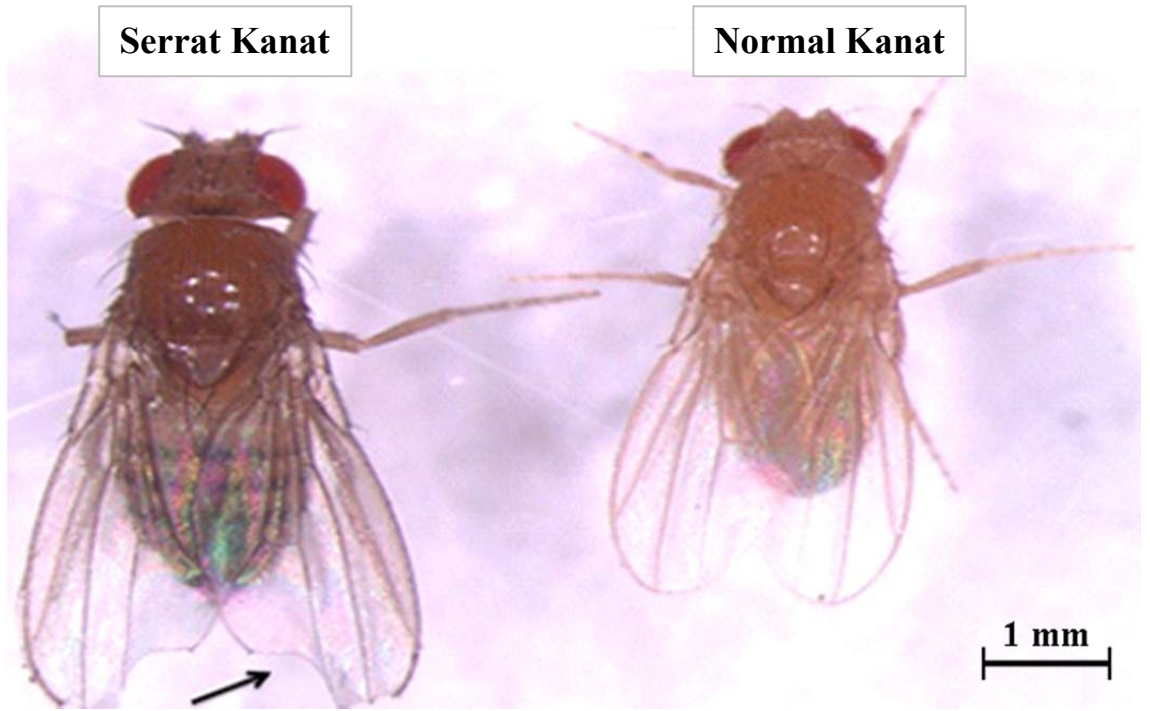
Şekil 3.3. *D. melanogaster*'de imajinal diskler ve oluşturdukları vücut kısımları (Anonymous 2012b)

Bu çalışmada, *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ya da diğer adıyla kanat benek testi kullanılmıştır. Şekil 3.4'de *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi şematik olarak gösterilmiştir.



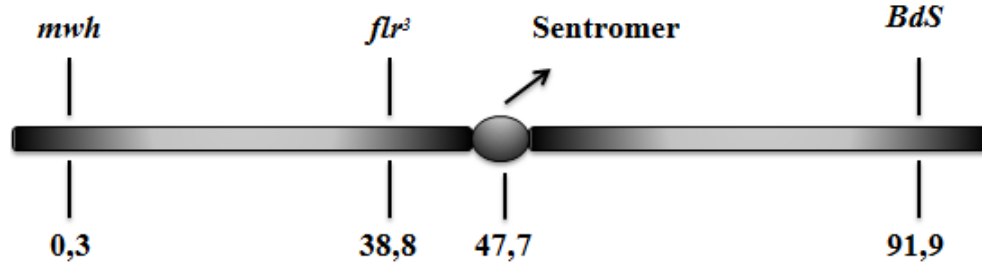
Şekil 3.4. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik gösterimi

Kanat benek testi için fenotipte gözlenebilen iki uygun işaret geni kullanılmaktadır. Bu belirleyici genlerden *flare* (*flr³*, 3-38,8) geni, kanatlardaki normal düz ve uzun kıllar yerine, körelmiş, nokta şeklinde kıl oluşturmaktadır. *flr³* geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir. Dolayısıyla ergin bireyler oluşamamaktadır. Hem bireyleri *flr³* geninin embriyonik letal etkisinden korumak, hem de rekombinasyonu baskılamak için dengeleyici *TM3* kromozomu kullanılmaktadır. Diğer bir belirleyici gen olan *mwh* (*multiple wing hair*=çoklu kanat kılları, 3-0,3) geni, kanat kıllarının aynı hücreden üç veya daha fazla sayıda çıkması şeklinde kendini göstermektedir. Normal kanatların kenarları düzgün bir şekilde iken, *BdS* genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün olmayıp testere dişi şeklindedir (Graf and Würgler 1996) (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. *D.melanogaster*'de serrat ve normal kanatlı bireyler

Belirleyici olarak kullanılan *mwh*, *flr³* ve *BdS* genleri *Drosophila*'nın en büyük kromozomu olan üçüncü kromozom üzerinde bulunmaktadır (Şekil 3.6). Belirleyici genler arasındaki mesafenin uzak olması, rekombinasyon ve mutasyonların büyük aralıkta incelenmesi açısından avantaj sağlamaktadır.



Şekil 3.6. Belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri

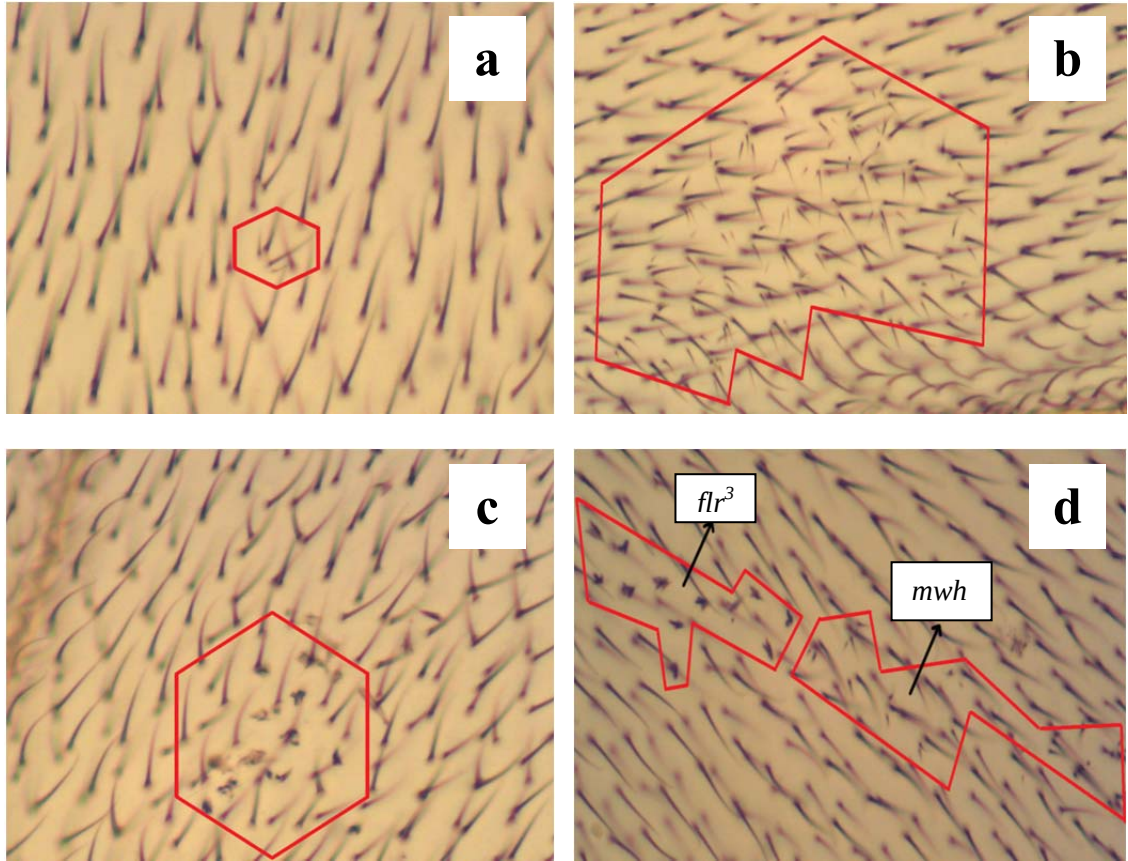
Bu çalışmada, çaprazlamalar sonucunda elde edilen trans-heterozigot larvalar kullanılarak değerlendirmeler yapılmıştır. Bu çaprazlamaların genotipik gösterimi aşağıdaki gibidir;

- ♂♂ *mwh* / *mwh* X *flr*³/*In*(3*LR*) *TM3*, *BdS* ♀♀

Yapılan çaprazlamada *flr*³ stoklarının dişi bireylerinin tercih edilmesinin nedeni, yumurta veriminin, *mwh* stoklarının dişilerine göre daha yüksek olmasıdır.

Dengeleyici-heterozigot bireylerde çok sayıdaki inversiyonlar nedeni ile rekombinasyonlar engellenmiştir (Schaik and Graf 1991). Kanat kıllarında beklenen somatik mutasyonu belirlemek amacı ile kanatlar ayrılarak mikroskop altında taranmıştır. Böylece, mutasyon ya da mitotik rekombinasyon sonucu heterozigotluğun kaybedilmesi ile ortaya çıkan mutant hücre klonları araştırılmıştır. Mutant hücre klonları farklı benek gruplarına ayrılarak kaydedilmiştir. Tekli benekler *mwh* veya *flr*³ fenotipinde iken, ikiz benekler *mwh* ve *flr*³ fenotiplerini birlikte taşımaktadır. Tekli benekler arasında 1-2 hücreli olanlar küçük tekli benek olarak isimlendirilirken 3 ve daha fazla sayıda hücre gruplarından oluşan beneklere ise büyük tekli benekler denilmektedir. Ayrıca, somatik hücrelerde genetik değişikliğin indüksiyon zamanı ve beneklerin büyüklüğü arasında pozitif bir ilişkinin olduğu belirtilmektedir. Eğer mutasyon, hücre bölünmesinin yoğun olduğu erken dönemde olursa, bu mutant hücreden köken alan hücreler daha fazla ve daha büyük benekler içerecektir (Guzman-Rincon and Graf 1995). İstatistik analizlerde kanat beneklerinin içerik ve büyüklüğüne

göre sınıflandırılması (küçük tekli benek, büyük tekli benek ve ikiz benek) ile oluşturulan veriler kullanılmaktadır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Çeşitli kanat benek tipleri (10x40)

***a:** *mwh* genotipindeki küçük tekli benek **b:** *mwh* genotipindeki büyük tekli benek, **c:** *flr³* genotipindeki büyük tekli benek, **d:** İkiz benek

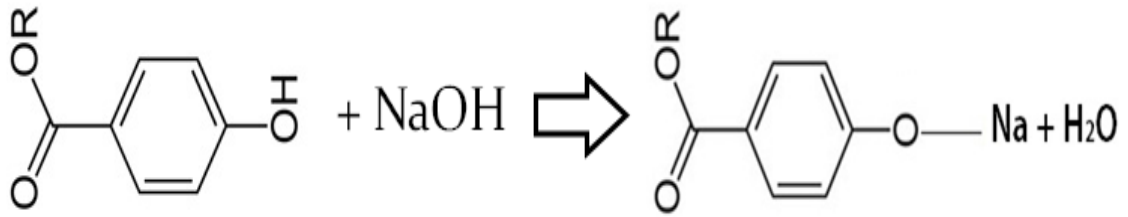
3.2.1.a. Çaprazlama için birey seçimi

Trans-heterozigot larvaların elde edilmesi için *flare* dişiler 4'er saat aralıklarla virgin iken toplanmış ve yeni bir besin ortamına alınmıştır. Yeterince virgin dişi birey toplandıktan sonra uygulamaların yapılacağı trans-heterozigot larvaların elde edilebilmesi için her şişede 40 *mwh* erkek, 40 *flare* dişi olacak şekilde çaprazlamalar yapılmıştır. Oogenezin gerçekleşmesi için erkek ve dişi bireyler en az bir gün süre ile aynı ortamda bırakılmıştır. Uygulama yapılacak olan larvaların aynı evrede olabilmesi

için oogenezi gerçekleştirmiş olan bireylerin 8 saat boyunca yeni bir besin ortamına alınarak bu süre boyunca yumurta bırakmaları sağlanmıştır. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanılmıştır.

3.2.1.b. Paraben çözeltilerinin hazırlanması ve deney gruplarına uygulanması

Çalışmamızda kullandığımız parabenlerin sudaki çözünürlüğünün oldukça az olması ve çözücü olarak kullanılan organik maddelerin *Drosophila*'ya zarar vermesinden dolayı öncelikle parabenlerin suda çözünebilir tuz formları oluşturulmuştur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Parabenlerin tuz formuna dönüştürülmesinin kimyasal gösterimi

Çalışmamızda ilk olarak parabenlerin *D. melanogaster* larvaları üzerindeki LD₅₀ (bir popülasyondaki bireylerin yarısını 24 saatte öldüren doz) dozları belirlenmiştir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda (100mM, 150mM, 250mM, 300mM ve 500mM) hazırlanan paraben çözeltilerinden 5mL alınarak içerisinde 1,5gr hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) bulunan kültür tüplerine 100'er larva konulmuş ve larvalardan ergine dönüşebilen bireyler sayılmıştır. Her bir deney 3'er kez tekrar edilmiştir. Sonuçta parabenlerin *D.melanogaster* larvalarında LD₅₀ dozu yaklaşık olarak 300mM olarak tespit edilmiştir. SMART uygulamalarında LD₅₀ dozundan daha düşük olan 100mM, 150mM, 200mM ve 250mM konsantrasyonlar kullanılmıştır. Bu amaçla parabenlerin 100mM, 150mM, 200mM, 250mM'lık çözeltileri hazırlanmış ve yukarıda anlatıldığı şekilde 72±4 saatlik larvalara uygulama yapılmıştır. Ayrıca hem pozitif etil metansülfonat (EMS) hem de negatif (distile su) kontrol gruplarına ait deney setleri hazırlanmıştır.

3.2.1.c. Ergin bireylerin toplanması ve kanat preparatlarının hazırlanması

Uygulama ortamında parabenlere maruz bırakılan larvalardan, pupa evresini takiben, çıkan ergin bireyler günlük olarak, eterle bayıltılarak toplanmış ve kanat preparatlarını hazırlamak için bu bireyler %70'lik etil alkole konularak +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Daha sonra bu bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (trans-heterozigot *mwh/flr³*) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3, BdS*) olarak iki gruba ayrılmıştır. Bunlardan normal fenotipe sahip (*mwh/flr³*) olan kanatlar, hem mutasyon, hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesine karşın, serrat kanatlar (*mwh/TM3, BdS*), dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içermektedir (Zordan *et al.* 1994). Bu nedenle, her iki fenotipteki kanatların da preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirilmiştir.

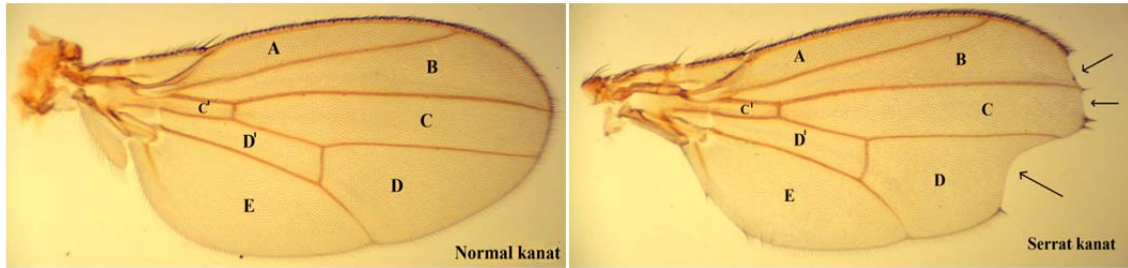
Kanat preparatlarını hazırlamak için Negishi *et al.* (1988) ve Schaik and Graf (1991)'ın çalışmalarında kullandıkları "Faure solüsyonu" hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Kanat preparatları hazırlanırken çukur lam üzerine faure solüsyonundan bir iki damla konulmuştur. Distile suya alınmış olan her bir sinek, faure solüsyonu damlatılmış çukur lama alınmıştır. Binoküler mikroskop altında ince uçlu pens ile kanatlar vücuda bağlandığı yerden tutularak kanat üzerindeki kıllara ve kanada zarar verilmeyecek şekilde vücuttan özenle ayrılmıştır. Her bir bireyin kanadı ayrıldıktan sonra aynı bireye ait kanatlar lam üzerine uygun aralıklarla yerleştirilmiştir. Lam üzerine yeterince kanat çifti (96 adet) yerleştirildikten sonra preparatlar kuruması için tozsuz bir ortamda bir gün bekletilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra lamlara bir iki damla entellan damlatılarak hava kabarcığı kalmayacak şekilde üzeri lamel (24x60mm) ile kapatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan preparatlar, musluk suyunda yıkanarak ışık mikroskopunda kılların görülmesini engelleyen safsızlıklar temizlenmiştir.

Çizelge 3.4. Faure solüsyonunun içeriği

MADDE	MADDE MİKTARI
Gam arabik	30g
Gliserol	20mL
Kloral hidrat	50g
Distile su	50mL

3.2.1.d. Kanat preparatlarının mikroskopik analizi

Temiz bir şekilde hazırlanmış olan kanat preparatları 10X40 büyütmede ışık mikroskopunda incelenmiştir. Kanatların incelenmesinde, kolaylık olması açısından kanatlar Şekil 3.9'daki gibi A, B, C, C', D, D' ve E sektörlerine ayrılmıştır.

**Şekil 3.9.** Normal ve serrat kanat fenotiplerine ait sektörler (10x10)

Kanatların mutant klon taşıyıp taşımadığını incelemek için, hem dorsal hem de ventral yüzeydeki hücre tabakaları ayrı ayrı incelenmiştir. Kanat yüzeyindeki her bir sektör ayrı ayrı taranarak *mwh* ve/veya *flr*³ mutant klonlar sayılarak kayıtları tutulmuştur. Sayımda kayıtları tutulan mutant klonlar aşağıdaki gibidir;

- Küçük tek tip klon (1-2 *mwh* hücre)
- Büyük tek tip klon (≥ 3 *mwh* veya ≥ 4 *flr*³ hücre)
- İkiz klon (*mwh* ve *flr*³ hücrelerin ikisini de yan yana içeren klonlar)

Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf *et al.* (1984) tarafından gösterilmiştir. Sınıflandırmada küçük tek tip klonlar yalnızca *mwh* hücrelerden oluşmaktadır. Varyasyonla oluşan ve *flr³* gibi görünen hücreleri mutantlardan ayırmak için sayıma 4'den daha fazla sayıdaki *flr³* hücreler dahil edilmiştir (Graf *et al.* 1984). Büyük tek tip klonlar ise 3 veya daha fazla *mwh* ya da *flr³* mutant hücrenin oluşturduğu klonlardır. İkiz klonlar, *mwh* ve *flr³* hücreler aynı klon içerisinde dağılmış olarak bulunduğu durumda oluşan klonlardır. İkiz klon, *mwh* ve *flr³* hücrelerin yan yana iki ayrı klon olarak bulunmasıyla da oluşabilir. Ancak, yan yana bulunan *mwh* ve *flr³* klonların arasındaki yabancı tip trikomların sayısı üçü geçmiyorsa aynı klon içerisinde değerlendirilerek ikiz klon denilmektedir.

3.2.1.e. Klon indüksiyon frekansının hesaplanması

Kronik uygulamada, her hücrede ve her hücre bölünmesindeki indüksiyon frekansı aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır (Szabad *et al.* 1983).

$$f = \frac{n}{NC} \times 10^5$$

Bu denkleme göre, sadece *mwh* klonları göz önüne aldığımızda, denklemdaki “f” *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “n” gözlenmiş olan toplam *mwh* klon sayısını, “N” analiz edilmiş olan kanat sayısını ve “C” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Bir kanat üzerinde incelenebilecek hücre sayısının önceki çalışmalarla 24 400 olduğu bilinmektedir (Würgler and Vogel 1986). Çaprazlamalar sonucunda oluşan trans-heterozigot larvalardan gelişen bireyler, kanat bakımından normal ve serrat kanat olmak üzere, iki farklı fenotipte gözlenmektedir. Serrat kanatlara sahip bireylerde bulunan dengeleyici kromozomun varlığı, bu kromozom parçası üzerine yerleştirilmiş dominant mutant bir gen olan *Serrate* (*Ser*) sayesinde tespit edilebilmektedir. Dengeleyici kromozomun (*TM3*) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle bu fenotipe sahip bireylerde gözlenen mutant klonlar, sadece

mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Böylece, serrat kanatlı bireylerden elde edilen verilerle normal kanatlı bireylerden elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla çalışmada kullanılan ajanın mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir (Vogel 1992; Frei and Würzler 1996).

3.2.1.f. SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

SMART ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi Microsta bilgisayar programı ile değerlendirilirken orijinal (null) hipotez (H_0)’de uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayılmıştır. Alternatif hipotez (H_a)’de ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayılmıştır. Orijinal ve alternatif hipotezlerin hesaplanmasıyla ortaya çıkan sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) ve negatif (-) olarak gösterilmiştir (Çizelge 3.5) (Selby and Olsen 1981; Frei and Würzler 1988).

Çizelge 3.5. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		H_a (Alternatif)	
		KABUL($1-\beta$)	RED(β)
H_0 (Null)	KABUL	ÖNEMSİZ FARK (i)	NEGATİF (-)
	($1-\alpha$)	$P=(1-\alpha)(1-\beta)= 1-\alpha-\beta + \alpha\beta$	$P=(1-\alpha)\beta= \beta-\alpha\beta$
	RED	POZİTİF (+)	ZAYIF POZİTİF (z)
	(α)	$P=\alpha(1-\beta)= \alpha- \alpha\beta$	$P= \alpha\beta$

3.2.2. *In vitro* kardeş kromatid değişimi (KKD) testi

Periferik kan kültürleri üzerinde uygulamış olduğumuz KKD yönteminde, hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması Evans (1976) ve Perry and Thomson (1984)'un metotlarına uygun olarak yapılmıştır.

3.2.2.a. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar

Yapılan ön denemeler ve mevcut literatür bilgileri doğrultusunda KKD ve MN testleri için uygun paraben konsantrasyonları 125, 250, 500 ve 1000µg/mL olarak belirlenmiştir. Bu dozların daha üstündeki konsantrasyonlarda (1250, 2000 ve 3000µg/mL) araştırma için yeterli hücre çoğalması sağlanamamıştır. Her uygulama için paraben çözeltileri ayrı ayrı ve taze hazırlanarak kullanılmıştır.

- **Etil metansülfonat (EMS) çözeltisi**

Çalışmamızda pozitif mutajen olarak kullanılan EMS %50'lik etil alkolde hazırlanmış ve kültür tüplerine son konsantrasyonu 0,7µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

- **5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) çözeltisi**

30,7mg toz BrdU 10mL distile suda çözülerek stok BrdU hazırlanmıştır (10^{-2} M). Stok çözelti alüminyum folyo ile sarılarak -20°C'de saklanmıştır.

- **Hipotonik çözelti**

0,5592gr KCl tartılarak 100mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0,075M olan KCl çözeltisi, kullanılmadan önce etüvde 37°C'ye kadar ısıtılmıştır.

- **Tespit (fiksatif) çözeltisi**

1 ölçek glasiyal asetik asitin üzerine 3 ölçek metanol eklenerek iyice karıştırılmıştır. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlanmıştır. Kullanmadan önce buzdolabında (+4°C’de) soğutulmuştur.

- **Hoechst (Bisbenzimid) fluoresan boya çözeltisi**

Stok Hoechst 33258 boyası, distile su ile son konsantrasyonu 2,5mg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Şişe alüminyum folyo ile sarılarak +4°C’de saklanmıştır.

- **2xSSC çözeltisi**

1,74gr NaCl, 100mL distile suda çözülmüştür. Ayrıca 0,882gr sodyum sitrat 100mL distile suda çözülmüştür. Her iki solüsyondan eşit hacimlerde alınmış ve karıştırılmıştır. Solüsyonun pH’sı sitrik asitle 7,2 olacak şekilde ayarlanmıştır.

- **Giemsa boya çözeltisi**

5mL giemsa boyası 95mL pH 6,8’lik söranson tamponu içine ilave edilerek 100mL’ye tamamlanmıştır. Üzerinin yağı kurutma kağıdı ile alınmış ve oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Söranson tamponu**

A solüsyonu: 4,537gr KH_2PO_4 500mL distile suda çözülmüştür.

B solüsyonu: 5,935gr Na_2HPO_4 500mL distile suda çözülmüştür.

A solüsyonundan bir miktar alınmış, pH 6,8'e gelinceye kadar B solüsyonu eklenerek 2 solüsyon karıştırılmıştır.

- **Fosfat tamponu (PBS) (pH:7)**

8gr NaCl, 0,2gr KCl, 0,2gr KH_2PO_4 ve 2,32gr Na_2HPO_4 alınmış ve 1 litre distile suda çözülmüştür. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Mc IlVaine tamponu**

Mc IlVaine tamponu 2 tampondan oluşmaktadır:

Tampon A : 0,1M anhidroz sitrik asit solüsyonu (19,2gr/L)

Tampon B : 0,2M anhidroz Na_2HPO_4 solüsyonu (28,4gr/L)

Tampon A'dan 8mL, tampon B'den 92mL alınmış, pH'sı sitrik asit ile 7,1'e ayarlanmış ve oluşan stok çözelti +4°C'de saklanmıştır.

3.2.2.b. Hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması

- 1) Steril hücre kültür tüplerine (cellstar) önceden hazırlanmış ve 37°C'ye getirilmiş besiyerinden (Kromozom Medyum B) 6mL konulmuştur.
- 2) Her tüpe 12 damla (0,5mL) kan damlatılmıştır.
- 3) Daha sonra her tüpe 6 damla (0,25mL) BrdU çözeltisi eklenmiştir.
- 4) Tüplerdeki kültürlere belirlenen konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan paraben çözeltilerinden 0,25mL ilave edilmiş ve iyice karışmaları sağlanmıştır.
- 5) Tüplerin üzeri alüminyum folyo ile sarılarak 37°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 6) Inkübasyonun başlangıcından 70 saat sonra her tüpe 5 damla kolşisin eklenmiştir.

- 7) Tüpler tekrar etüve konarak (37°C’de) 2 saat daha beklenmiştir.
- 8) 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1000rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 9) Santrifüj işlemi sonrası süpernatant pastör pipeti ile atılmıştır.
- 10) Tüplerde kalan çökeltinin (pellet) üzerine 5-6mL hipotonik çözelti yavaş yavaş eklenmiş ve diplerde tortu kalmaması için iyice karıştırılmıştır.
- 11) Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37°C’ye ayarlanmış etüvde 25 dk bekletilmiştir.
- 12) Süre sonunda tüpler 1000rpm’de tekrar 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant aynı şekilde atılmıştır.
- 13) Süpernetant atıldıktan sonra tüplerde kalan pelletler üzerine, taze olarak hazırlanmış soğuk tespit çözeltisinden 7mL vortekslenerek yavaş yavaş ilave edilmiş ve 1000rpm’de 10 dk santrifüj işlemine alınmıştır. Santrifüj işleminden sonra pipetle süpernetant kısmı atılmıştır.
- 14) Son basamak tüplerdeki görüntü iyice berrak oluncaya kadar ortalama 2-3 kez tekrarlanmıştır.
- 15) Tüplerdeki süpernetant son olarak atılmış ve kalan pellet pastör pipetiyle pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- 16) Pipetle çekilen pellet, üzerine protokol numarası yazılmış ve soğuk (+4°C) tespit çözeltisi içerisinde bekletilen lamlara yaklaşık 20-25cm yükseklikten damlatılmıştır. Damlaların birbirinin üzerine gelmeden lama iyice yayılmasına dikkat edilmiştir.
- 17) Bu şekilde hazırlanan preparatlar gün ışığı görmeyecek şekilde boyanmak üzere 3 gün kurumaya bırakılmıştır.

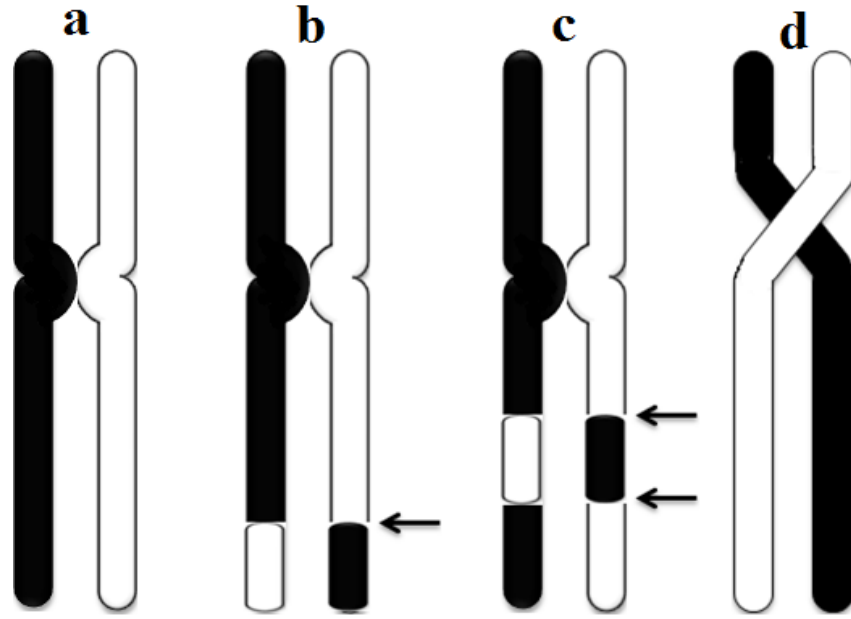
3.2.2.c. Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması

- 1) 3. günün sonunda iyice kuruyan preparatlar 15 dk PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.
- 2) 100mL PBS çözeltisi içerisine son konsantrasyonu 0,5mg/mL olacak şekilde Hoechst 33258 floresan boyasından konulmuştur. Preparatlar bu çözelti içinde 25 dk karanlık bir ortamda bekletilmiştir.
- 3) Daha sonra preparatlar içlerinde Mc IIVaine tamponu bulunan şalelere koyulmuştur.

- 4) Şalelerden çıkartılan preparatlar bir tepsiye dizilmiş ve üzerlerini örtecek şekilde Mc IlVaine tamponu dökülerek lamellerle kapatılmıştır.
- 5) Bu şekilde hazırlanan preparatlar ultraviyole lamba altında (366nm) 60 dk UV ışınına maruz bırakılmıştır..
- 6) Daha sonra, preparatlar musluk suyu altında iyice yıkanarak içerisinde 2xSSC çözeltisi bulunan şalelere dizilmiş ve 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda 60 dk bekletilmiştir.
- 7) Preparatlar tekrar su ile yıkanmış ve 13 dk Giemsa boyasında bekletilmiştir.
- 8) Süre sonunda preparatlar tekrar musluk suyundan geçirilerek oda sıcaklığında ve karanlık ortamda kurumaya bırakılmıştır.
- 9) Kuruyan lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatılmış ve incelemeye hazır daimi preparatlar hazırlanmıştır.

3.2.2.d. Mikroskobik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar, Boeco marka trinoküler ışık mikroskobunda immersiyon objektifi ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede). KKD sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 metafaz plağında (4 kişiden toplam 100 metafaz plağı) saptanmıştır. BrdU'dan dolayı ikinci mitozun metafaz aşamasındaki hücrelerin kromozomlarında kromatidler farklı boyanacaktır (Şekil 3.10.a). Koyu boyanan kromatidde açık, açık boyanan kromatidde ise koyu renk olarak görünen kısımlar KKD değerlerini yansıtmaktadır. KKD sayıları hesaplanırken parça değişimlerinin kromozomların hangi kısımlarından olduğu dikkate alınmıştır. Kromozomların uçlarından bir parça değişimi olmuş ise bu bir KKD (Şekil 3.10.b), ortalarından parça değişimi olmuş ise bu iki KKD (Şekil 3.10.c) olarak sayılırken, kromatidlerin sentromerden geçiş gösterdiği bölgeler (Şekil 3.10.d) KKD olarak değerlendirilmemiştir.



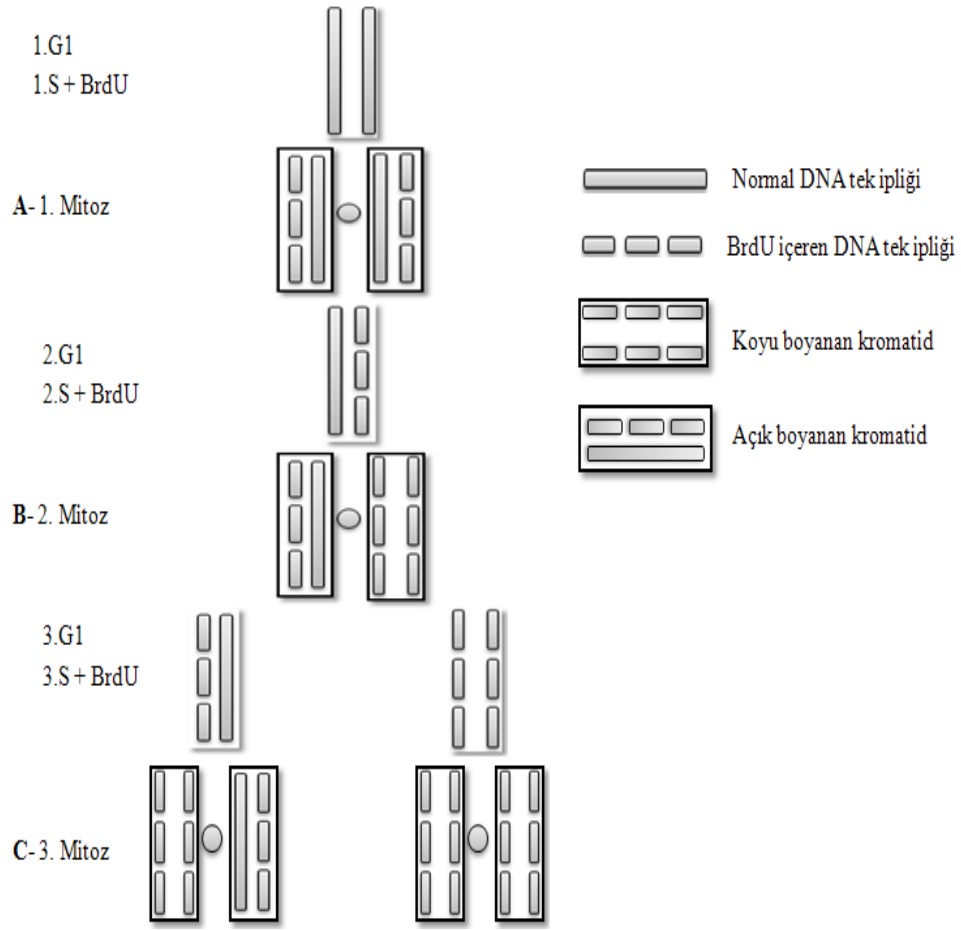
Şekil 3.10. KKD'lerin sayılmasında esas alınan kriterler

*a: KKD yok, b: 1 KKD, c: 2 KKD, d: KKD yok

Ayrıca parabenlerin DNA replikasyonu üzerindeki etkilerini saptamak amacı ile replikasyon indeksi ($R\dot{I}$) hesaplanmıştır. Bu hesaplama için rastgele seçilmiş 100 metafaz plağı içerisinde birinci, ikinci ve üçüncü metafaz evresindeki plaklar ayrılarak sayılmış ve kaydedilmiştir (Şekil 3.11). Bu verilerden yola çıkarak $R\dot{I}$ aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

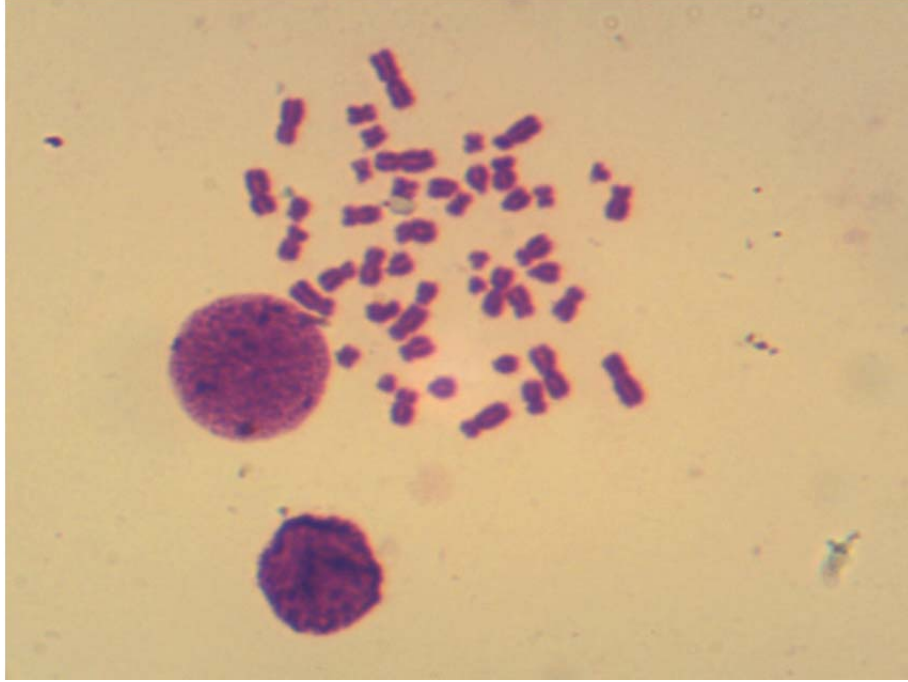
$$R\dot{I} = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3)/100$$

(M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı; M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı; M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı)

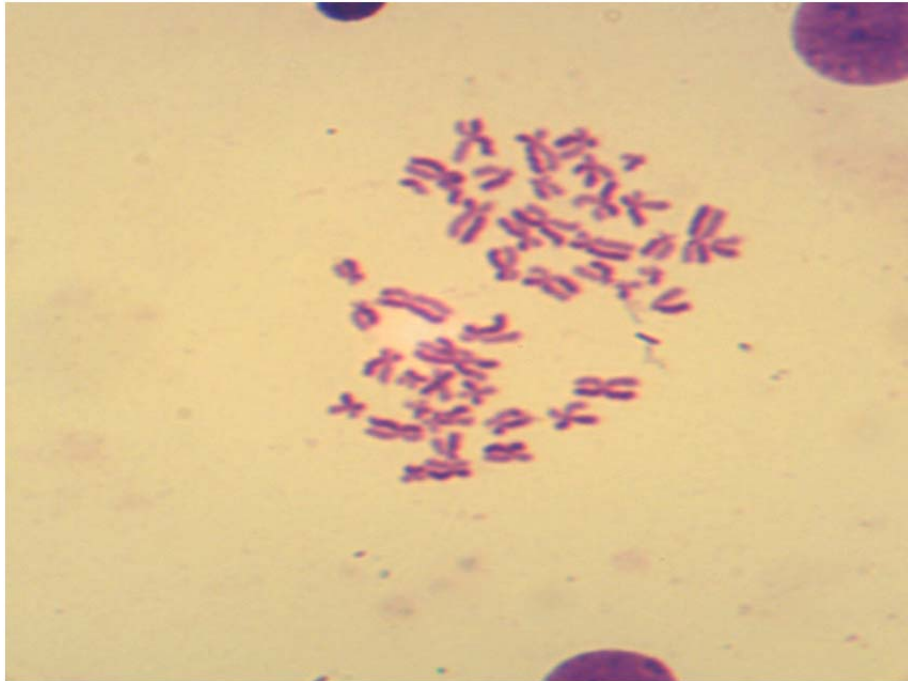


Şekil 3.11. 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak gösterimi

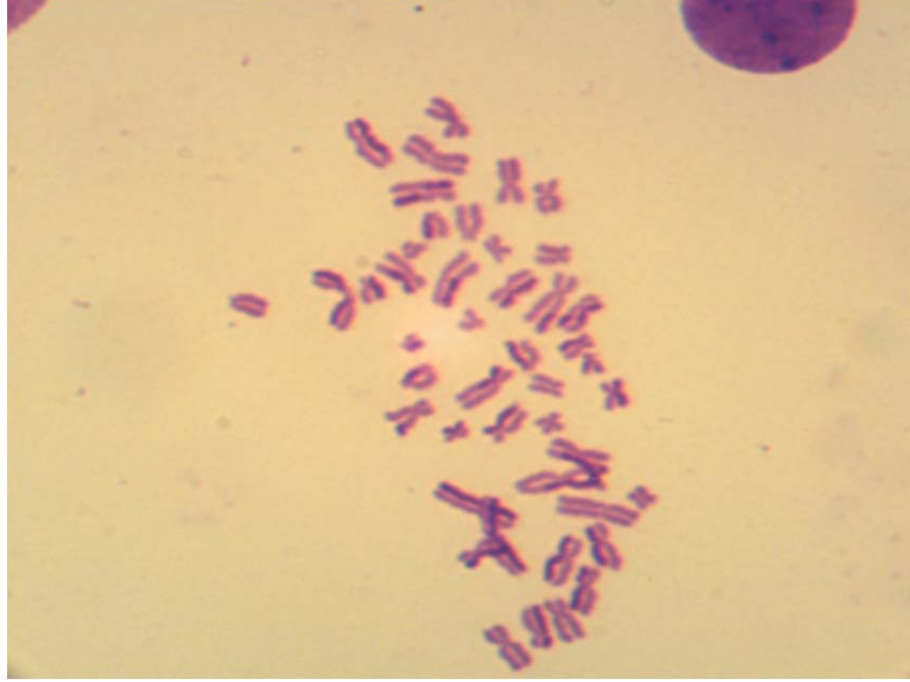
1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin kromozomları boyandığında, kromozomun her iki kromatidinin de homojen koyu renkte (Şekil 3.12), 2. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin kromozomları boyandığında tüm kromozomlarının kromatidlerinden birinin koyu diğerinin ise açık renkte (Şekil 3.13), 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin kromozomları boyandığında ise bazı kromozomların her iki kromatidinin açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidinin açık, diğer kromatidinin de koyu renkte (Şekil 3.14) olmaktadır. KKD çalışmalarında bu metafaz plaklarından 2. mitoz bölünmeyi geçirmiş hücreler tercih edilmektedir.



Şekil 3.12. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (10x100)



Şekil 3.13. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (10x100)



Şekil 3.14. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücreye ait kromozomlar (10x100)

3.2.3. *In vitro* mikronükleus (MN) testi

Mikronükleus sayısını saptamak için Fenech (2000) ve Kirsch-Volders *et al.* (2003) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

3.2.3.a. Kullanılan çözeltiler ve tamponlar

- **Etil metansülfonat (EMS) çözeltisi**

Çalışmamızda pozitif mutajen olarak kullanılan EMS %50'lik etil alkolde hazırlanmış ve kültür tüplerine son konsantrasyonu 0,7µg/mL olacak şekilde ilave edilmiştir.

- **Hipotonik çözelti**

0,5592gr KCl tartılarak 100mL distile suda çözülmüştür. Konsantrasyonu 0,075M olan KCl çözeltisi kullanılmadan önce etüvde 37°C'ye kadar ısıtılmıştır.

- **Tespit (fiksatif) çözeltisi**

1 ölçek glasiyal asetik asitin üzerine 3 ölçek metanol eklenerek iyice karıştırılmıştır. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlanmış ve kullanmadan önce buzdolabında (+4°C'de) soğutulmuştur.

- **Giemsa boya çözeltisi**

3mL giemsa boyası 97mL pH 6,8'lik söranson tamponu içine ilave edilerek 100mL'ye tamamlanmıştır. Üzerinin yağı kurutma kağıdı ile alınmıştır. Çözelti oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Söranson tamponu**

A solüsyonu: 4,537gr KH_2PO_4 500mL distile suda çözülmüştür.

B solüsyonu: 5,935gr Na_2HPO_4 500mL distile suda çözülmüştür.

A solüsyonundan bir miktar alınmış, pH 6,8'e gelinceye kadar B solüsyonu eklenerek 2 solüsyon karıştırılmıştır.

3.2.3.b. Hücre kültürünün yapılması ve preparatların hazırlanması

- 1) Steril hücre kültür tüplerine (cellstar) önceden hazırlanmış ve 37°C'e getirilmiş besiyerinden (Kromozom Medyum B) 6mL konulmuştur.
- 2) Her tüpe 12 damla (0,5mL) kan damlatılmıştır.
- 3) Tüplerdeki kültürle belirlenen konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) hazırlanan paraben çözeltilerinden 0,25mL ilave edilmiş ve iyice karışmaları sağlanmıştır.
- 4) Tüpler 37°C'lik etüvde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- 5) İnkübasyonun başlangıcından 48 saat sonra sitokalazin-B'den son konsantrasyonu 3µg/mL olacak şekilde tüm kültür tüplerine eklenmiştir.
- 6) Tüpler tekrar etüve konarak (37°C'de) 72 saatlik inkübasyon süresinin tamamlanması beklenmiştir.
- 7) 72 saatin sonunda etüvden çıkarılan tüpler 1000rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 8) Santrifüj işlemi sonrası süpernatant pastör pipeti ile atılmıştır.
- 9) Tüplerde kalan çökeltinin (pellet) üzerine 5-6mL hipotonik çözelti yavaş yavaş eklenmiştir.
- 10) Hipotonik çözelti eklenen tüpler 37°C'ye ayarlanmış etüvde 25 dk bekletilmiştir.
- 11) Süre sonunda tüpler 1000rpm'de tekrar 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant aynı şekilde atılmıştır.
- 12) Süpernetant atıldıktan sonra tüplerde kalan pelletler üzerine, taze olarak hazırlanmış soğuk tespit çözeltilerinden 7mL vortekslenerek ilave edilmiş ve 1000rpm'de 10 dk santrifüj işlemine alınıp oluşan süpernetant pastör pipeti ile çekilerek atılmıştır.
- 13) Son basamak tüplerdeki görüntü iyice berrak oluncaya kadar ortalama 2-3 kez tekrarlanmıştır.
- 14) Tüplerdeki süpernetant son olarak atılmış ve kalan pellet pastör pipetiyle pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- 15) Pipetle çekilen pellet, üzerine protokol numarası yazılmış ve soğuk (+4°C) tespit çözeltileri içerisinde bekletilen lamlara yaklaşık 20-25cm yükseklikten damlatılmıştır. Damlaların birbirinin üzerine gelmeden lama iyice yayılmasına dikkat edilmiştir.
- 16) Bu şekilde hazırlanan preparatlar boyanmak üzere 3 gün kurumaya bırakılmıştır.

3.2.3.c. Preparatların boyanması ve daimi preparatların hazırlanması

- 1) 3. günün sonunda iyice kuruyan preparatlar 15 dk Giemsa boyasında bekletilmiştir.
- 2) Süre sonunda preparatlar musluk suyundan geçirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- 3) Kuruyan lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatılmış ve incelemeye hazır daimi preparatlar hazırlanmıştır.

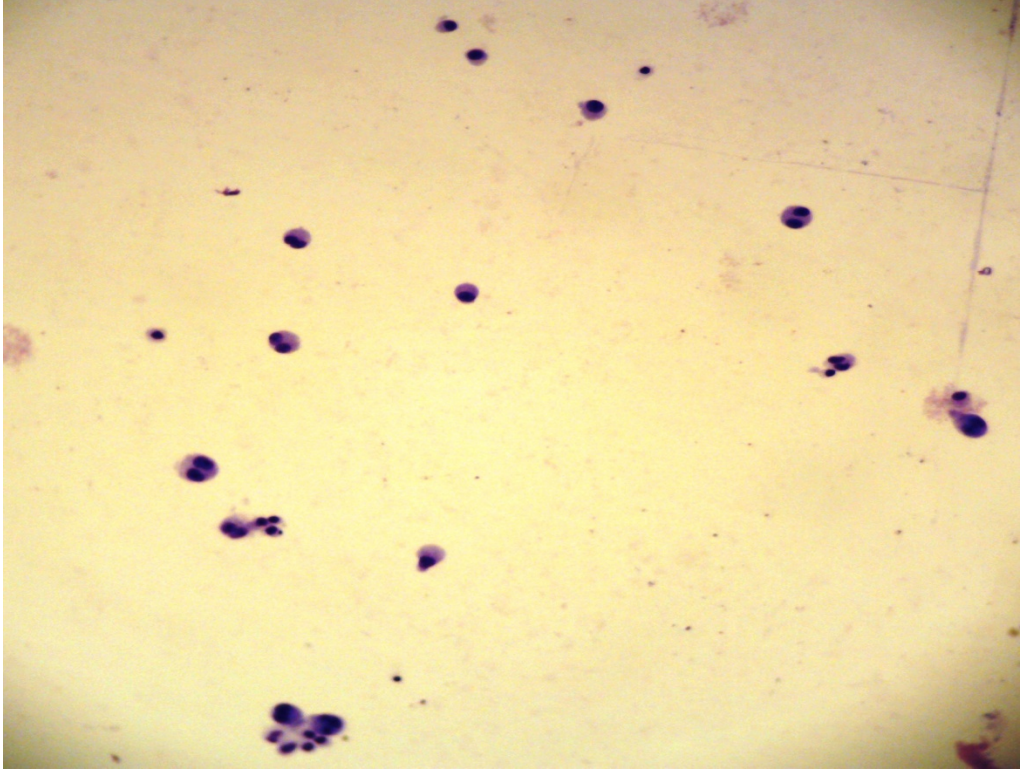
3.2.3.d. Mikroskopik inceleme

MN sayımı Countryman and Heddle (1976) tarafından ortaya konan kriterlere göre yapılmıştır. Bu kriterler;

- MN çapının esas çekirdeğin 1/3'ünden küçük olması,
- Boya alma yoğunluğunun esas çekirdek ile aynı olması,
- MN'lerin asıl çekirdeğe bağlı veya bitişik olmaması,
- Sadece sitokinezi bloke edilmiş çift çekirdekli hücrelerdeki MN'lerin sayılması esaslarını kapsamaktadır (Fenech 2000; Demirel ve Zamani 2002).

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Boeco marka trinoküler ışık mikroskopunda incelenirken önce 10'luk objektifte saha tespiti yapılmış (Şekil 3.15) daha sonra 40'luk objektif ile hücreler tek tek sayılmıştır.

Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 adet iki nükleuslu (binükleer) hücre sayılmış, bu iki nükleuslu hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmış ve kaydedilmiştir.

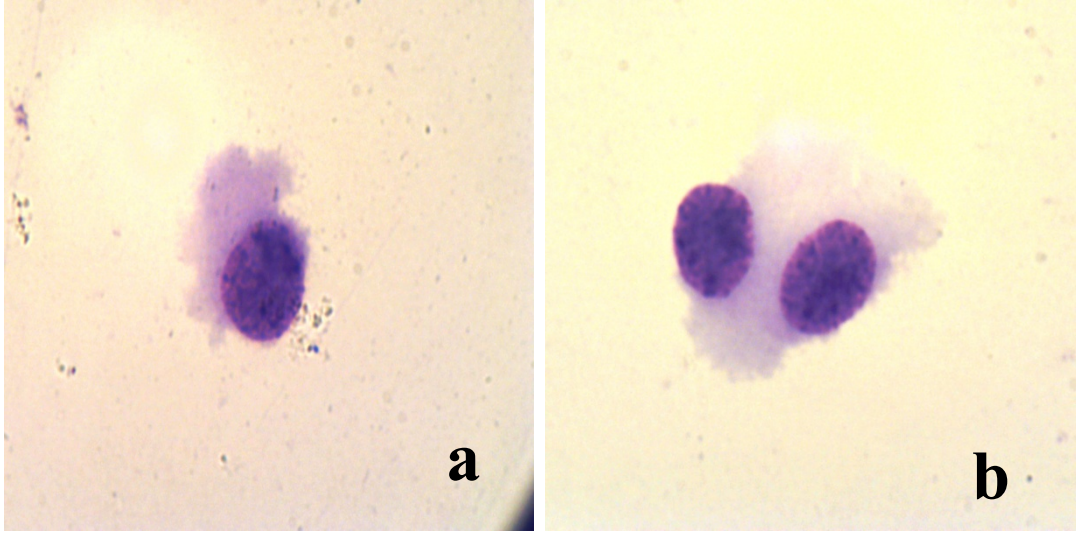


Şekil 3.15. MN testi mikroskopik inceleme sahası genel görünümü (10x10)

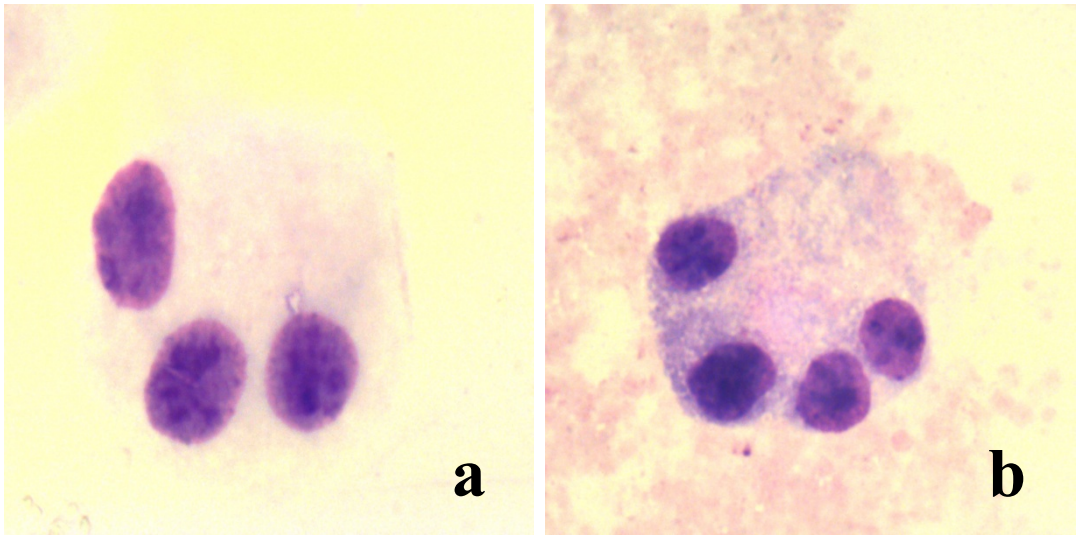
Ayrıca parabenlerin sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla aynı kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 hücre sayılmış ve bu hücreler arasından bir, iki, üç ve dört nükleuslu olanların oranı saptanmıştır (Şekil 3.16 ve Şekil 3.17). Bu orandan yola çıkarak Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) hesaplanmıştır (Fenech 2000). Hesaplama aşağıdaki formüle göre yapılmıştır.

$$\text{NBİ} = (1 \times N1 + 2 \times N2 + 3 \times N3 + 4 \times N4)/1000$$

(N1: 1 nükleuslu hücre sayısı; N2: 2 nükleuslu hücre sayısı; N3: 3 nükleuslu hücre sayısı; N4: 4 nükleuslu hücre sayısı)



Şekil 3.16. Bir (a) ve iki (b) nükleus içeren hücreler (10x100)



Şekil 3.17. Üç (a) ve dört (b) nükleus içeren hücreler (10x100)

3.2.4. KKD ve MN testleri ile elde edilen sonuçların istatistiksel analizi

Çalışmalarımızdan elde ettiğimiz KKD, MN, Rİ ve NBİ değerleriyle ilgili istatistiksel analizler için, SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 13.0 programı kullanılmıştır. Elde edilen verilerin distile su kontrol ve uygulama grupları arasında

karşılaştırılması için tek değişkenli varyans analizi (ANOVA) ve Tukey testleri uygulanmıştır.

3.2.5. Mikrofotografi

SMART, KKD ve MN testleri ile ilgili fotografik işlemler, Genetik Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Boeco marka (BM-180/T/SP) trinoküler mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesiyle (5,0 Megapiksel), *D.melanogaster*'in ergin bireylerine ait fotoğraflar ise Nikon marka (SMZ-10) stereo mikroskoba bağlı dijital fotoğraf makinesiyle (5,0 Megapiksel) çekilmiştir. Ayrıca fotoğraf çekiminde kullanılan ölçekler resimler ile birlikte verilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu araştırmada, gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan çeşitli parabenlerin genotoksik etkili olup olmadığı *in vivo* olarak *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ve *in vitro* olarak kültüre alınmış insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi ile mikronükleus testi kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır.

4.1. Trans-heterozigot Larvalar İçin Hayatta Kalış Oranlarının (Larval Mortalite) Belirlenmesi

Çalışmalarımızda ilk olarak parabenlerin (etilparaben, bütülpaben, metilparaben ve propilparaben) *D. melanogaster* larvaları üzerindeki LD₅₀ (bir populasyondaki bireylerin yarısını 24 saatte öldüren doz) dozları belirlenmiştir. Bu amaçla Bölüm 3'te anlatıldığı gibi her paraben için ayrı ayrı deney setleri oluşturulmuş ve farklı konsantrasyonlarda (100mM, 150mM, 250mM, 300mM ve 500mM) hazırlanan paraben çözeltileri *Drosophila* larvalarına uygulanmıştır. Sonuçta *D. melanogaster*'in 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalarında tüm parabenler için LD₅₀ dozu 300mM olarak tespit edilmiştir. Hem larvalar için hayatta kalış oranının belirlenmesinde hem de SMART uygulamalarında LD₅₀ dozundan daha düşük olan 4 farklı uygulama dozu (100mM, 150mM, 200mM ve 250mM) kullanılmıştır. Çalışmalarımızda, genotoksik etkileri araştırılan parabenlerin dışında, negatif kontrol grubu için parabenlerin çözücüsü olan distile su, pozitif kontrol grubu için de mutajenik etkisi iyi bilinen etil metansülfonat (EMS) kullanılmıştır.

Deneylerimize başlarken, öncelikle *D. melanogaster*'in ♂*mwh* ve ♀*flr*³ mutant soylarına ait bireylerin çaprazlanmaları ile elde edilen trans-heterozigot larvalar kullanılarak onlar için hayatta kalış oranları (larval mortalite) belirlenmiştir. Bu amaçla etil, bütülpaben, metil ve propilparabenin farklı konsantrasyonlarını (100mM, 150mM, 200mM ve 250mM) içeren uygulama gruplarına ve pozitif kontrol grubu olarak seçilen etil metansülfonat (EMS) içeren besiyerlerine 100'er larva konulmuştur. Bu larvalardan

erginleşebilen ve ölen bireyler sayılmış ve distile su kontrol grubundan elde edilen verilerle istatistiki olarak karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.1).

Elde edilen veriler incelendiği zaman, distile su kullanılarak hazırlanan negatif kontrol grubunda hayatta kalan larva sayısı %98 iken 1mM EMS kullanılarak hazırlanan pozitif kontrol grubunda bu oran %85'dir. Negatif ve pozitif kontrol grupları arasındaki fark istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde önemli bulunmuştur. Parabenler için hayatta kalış oranları ise; etilparaben uygulama grubunda 100mM, 150mM, 200mM ve 250mM konsantrasyon için sırasıyla %98; %92; %85 ve %80, bütılparaben uygulama grubunda %95; %91; %87 ve %74, metilparaben uygulama grubunda %95; %90; %78 ve %70 ve propilparaben uygulama grubunda %90; %84; %79 ve %63 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Yine parabenler için en toksik etki %63 hayatta kalış oranıyla 250mM propilparaben uygulama grubunda gözlenmiştir ($p < 0,05$).

Çizelge 4.1'de belirtilen hayatta kalış oranları incelendiği zaman, paraben uygulama gruplarının tümünde konsantrasyon artışına paralel olarak bu oranın azaldığı, mortalite oranının ise arttığı görülmektedir. Bu veriler, parabenler için çözücü olarak kullanılan distile su (negatif kontrol grubu) ile karşılaştırıldığı zaman, yalnızca etilparabenin 100mM'lık konsantrasyonu dışındaki tüm uygulama gruplarında sonuçlar istatistiki olarak $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı olmuştur.

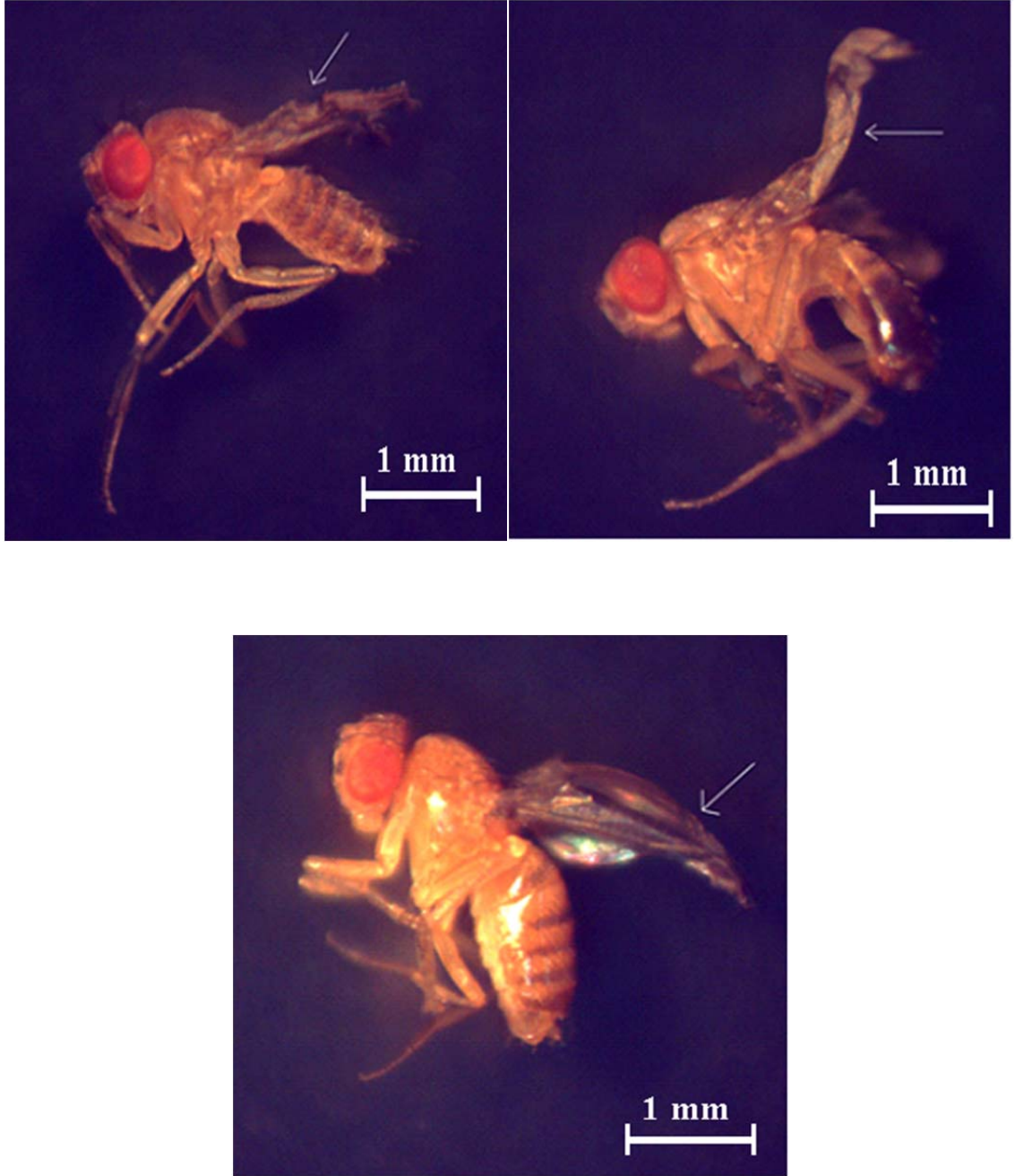
Tüm uygulama gruplarından elde edilen bulguların kendi aralarında ve kontrol grubuyla karşılaştırmaları sonucu elde edilen toksisite sıralamasının etilparaben < bütılparaben < metilparaben < propilparaben şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı konsantrasyonlarda parabenlere maruz kalan trans-heterozigot larvaların hayatta kalış ve mortalite oranları

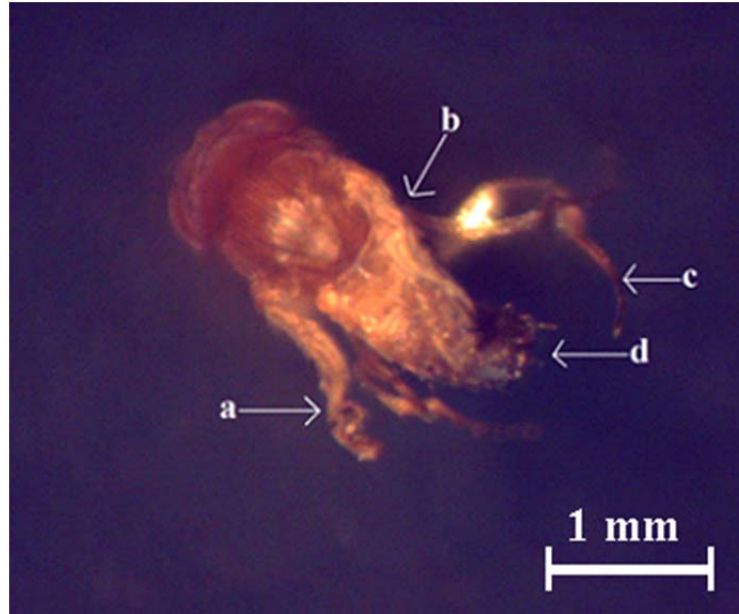
Uygulama Grupları	Konsantrasyon (mM)	Larva Sayısı	Mortalite Oranı (%)	Hayatta Kalış Oranı (%)
Kontrol (Distile su)	-	100	2 ^a	98 ^a
EMS	1	100	15 ^d	85 ^d
Etilparaben	100	100	2 ^a	98 ^a
	150	100	8 ^c	92 ^c
	200	100	15 ^d	85 ^d
	250	100	20 ^e	80 ^e
Bütilparaben	100	100	5 ^b	95 ^b
	150	100	9 ^c	91 ^c
	200	100	13 ^d	87 ^d
	250	100	26 ^f	74 ^f
Metilparaben	100	100	5 ^b	95 ^b
	150	100	10 ^c	90 ^c
	200	100	22 ^e	78 ^e
	250	100	30 ^g	70 ^g
Propilparaben	100	100	10 ^c	90 ^c
	150	100	16 ^d	84 ^d
	200	100	21 ^e	79 ^e
	250	100	37 ^h	63 ^h

*İstatistiksel değerlendirmeler grup içi ve gruplar arası yapılmıştır. Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler P<0,05'e göre önemlidir.

Çalışmalarımız sırasında yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 250mM) uygulanan parabenlerin muhtemel toksik etkilerinden kaynaklanan malformasyonlu bireyler de elde edilmiştir. Larvalardan gelişen ergin bireylerin bazılarının bu malformasyonları kanat, abdomen veya halter organı gibi tek bir vücut bölgesinde (Şekil 4.1) bazılarının da tüm bu malformasyonları bir arada taşıdıkları görülmüştür (Şekil 4.2). Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda parabene maruz bırakılan bazı larvaların pupa evresine geçemediği (Şekil 4.3), bazı erginleşen bireylerin de negatif kontrol grubu bireylerinden vücut büyüklüğü bakımından oldukça küçük olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4).

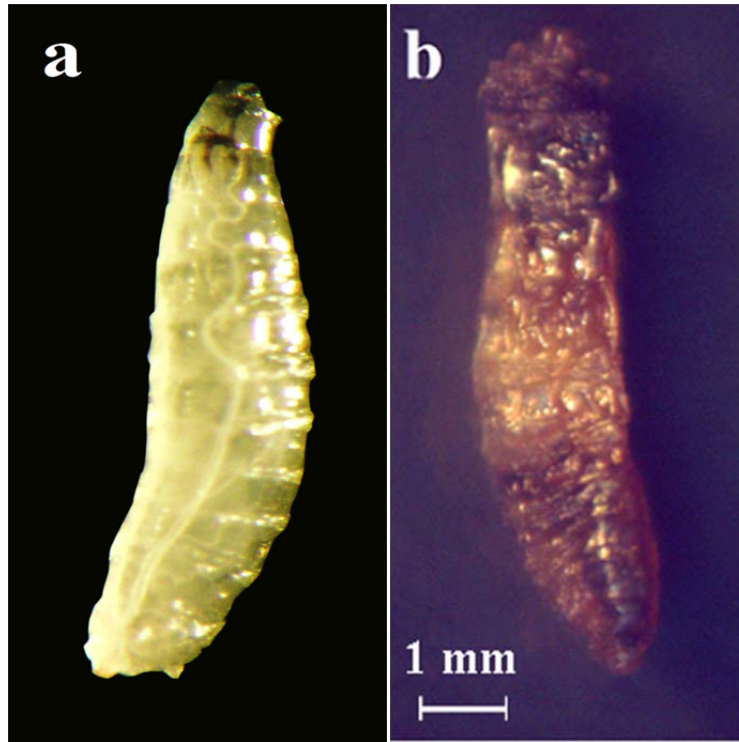


Şekil 4.1. Yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış larvalardan gelişen bireylerde gözlenen kanat malformasyonları

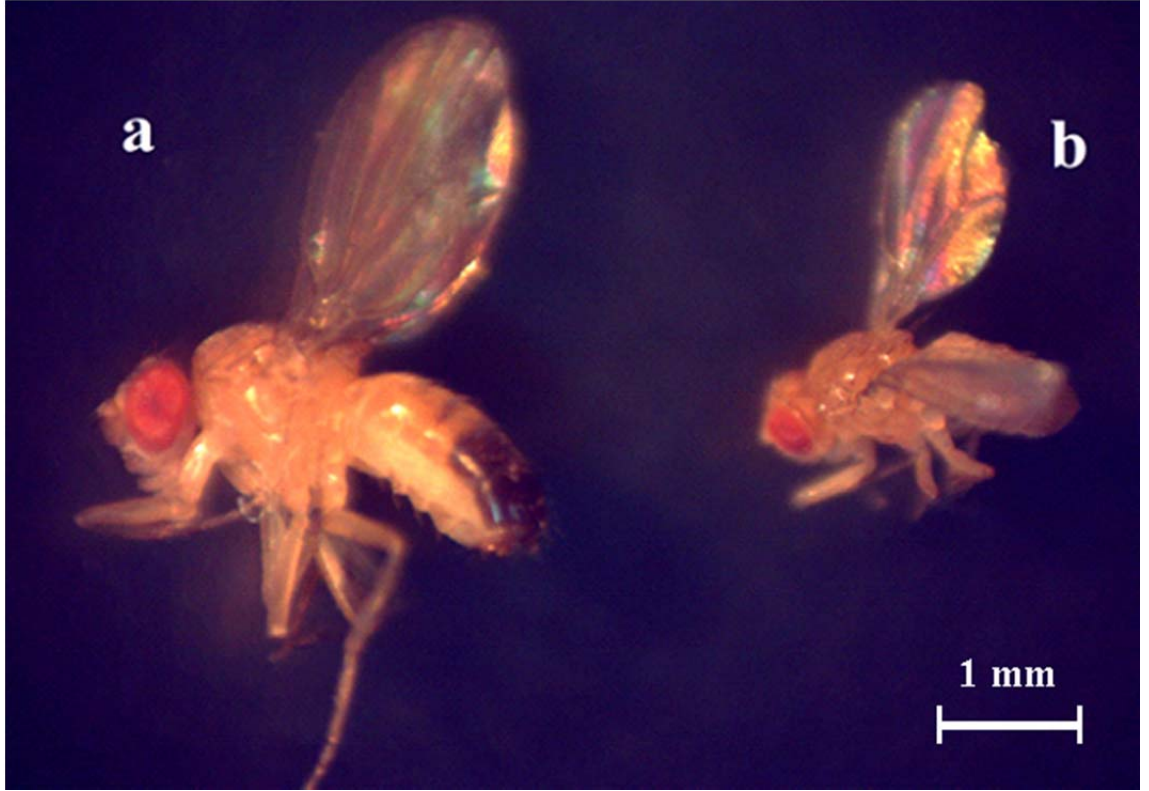


Şekil 4.2. Yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış larvalardan gelişen, birden fazla malformasyonu bir arada taşıyan bireyler

*a: kıvrık kanat anormalliği, b: halter organının bir tanesinin hiç oluşmaması, c: bacak eklemlerinin eksik oluşu, d: abdomen anormalliği



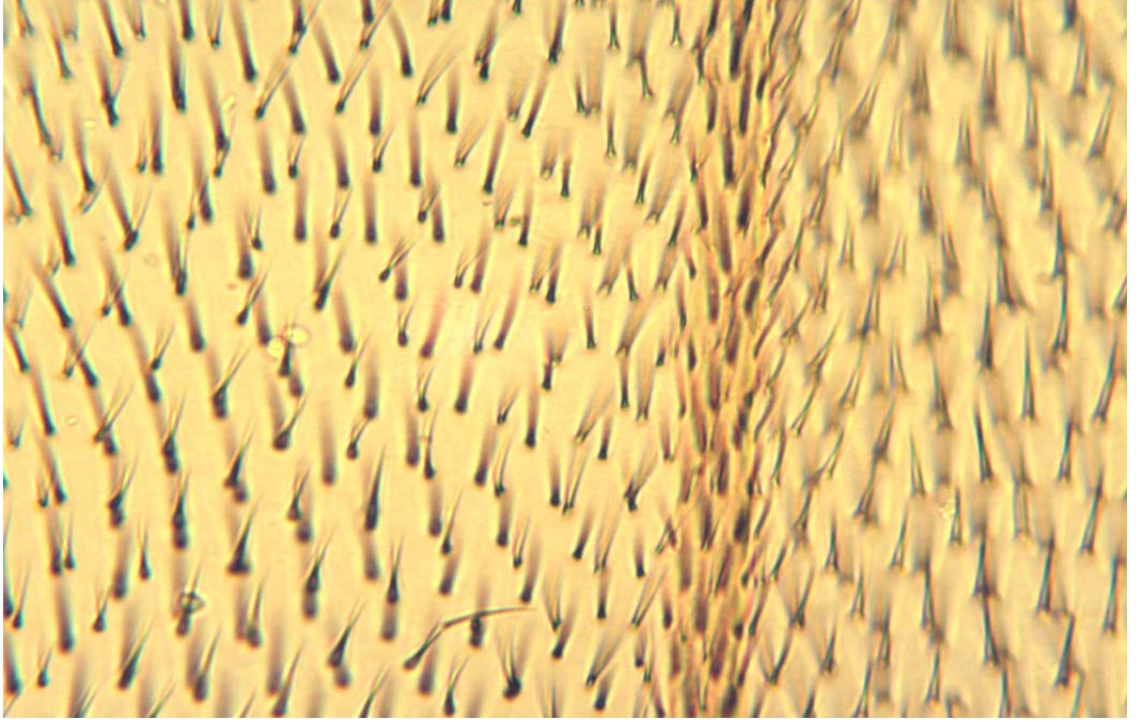
Şekil 4.3. a: yabanıl tip larva, b: yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış ve pupa evresine geçememiş larva



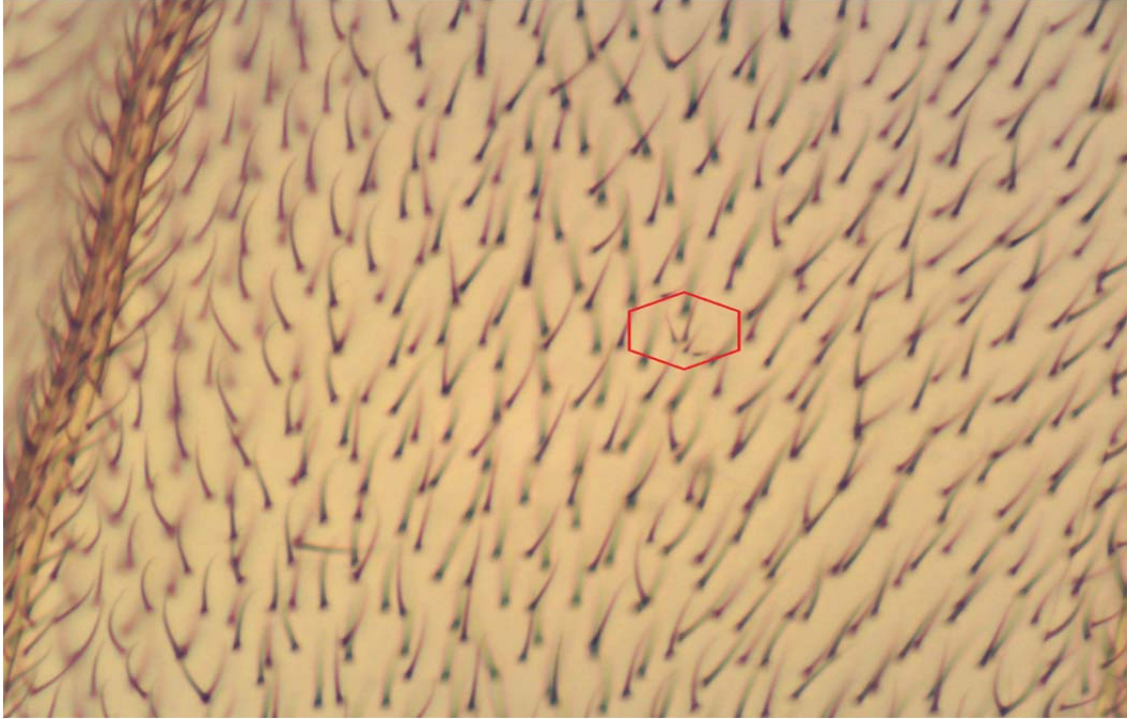
Şekil 4.4. a: yabanıl tip ergin birey, b: yüksek konsantrasyonda parabene maruz kalmış küçük vücut yapısına sahip ergin birey

4.2. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile Elde Edilen Bulgular

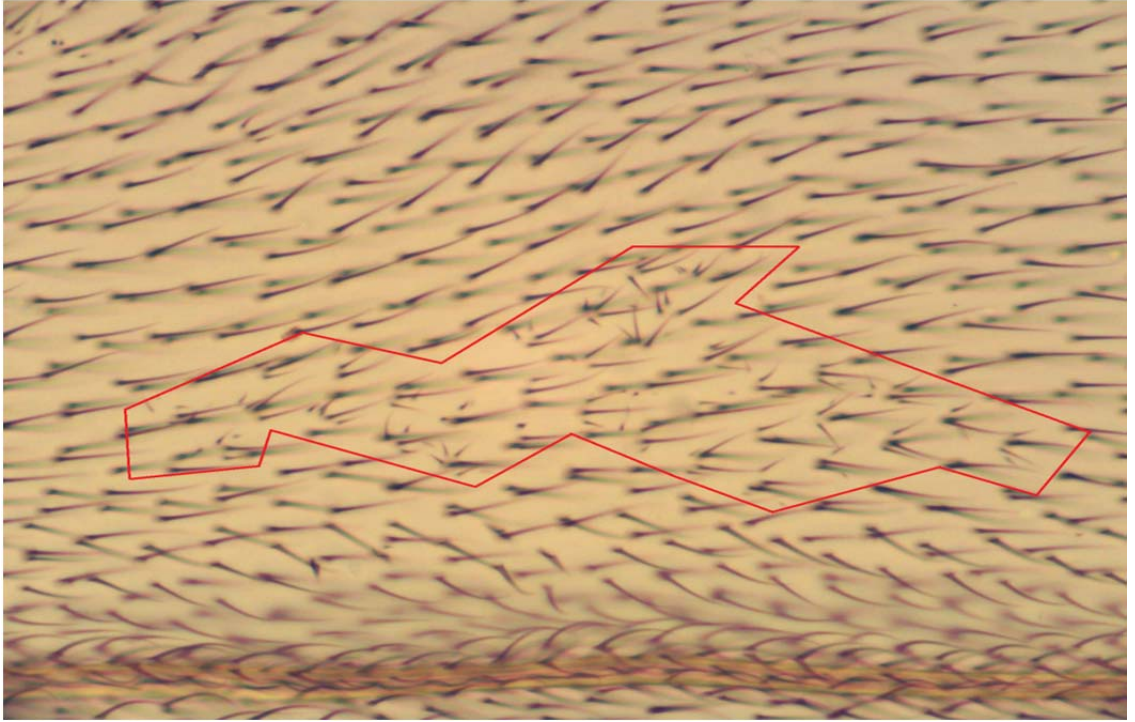
Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin yapılabilmesi için, farklı konsantrasyonlarda dört farklı paraben uygulaması sonucunda ergin bireylerden elde edilen normal (*mwh/flr³*) ve serrat kanat (*mwh/TM3*) fenotipine ait kanat preparatları ışık mikroskopunda 400X büyütme ile incelenmiştir. Gözlenen kanat benekleri sınıflandırılarak sayılmış ve kontrol grubundan elde edilen verilerle karşılaştırılmak üzere çizelgeler oluşturularak kaydedilmiştir (Çizelge 4.2-4.6). Ayrıca incelenen preparatlarda, herhangi bir benek tipini taşımayan (Şekil 4.5) yabanıl tip kanat ile tüm parabenler için gözlediğimiz, küçük tek tip (Şekil 4.6), büyük tek tip (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8) ve ikiz benekleri (Şekil 4.9.a ve 4.9.b) taşıyan kanatlara ait fotoğraflar çekilmiştir.



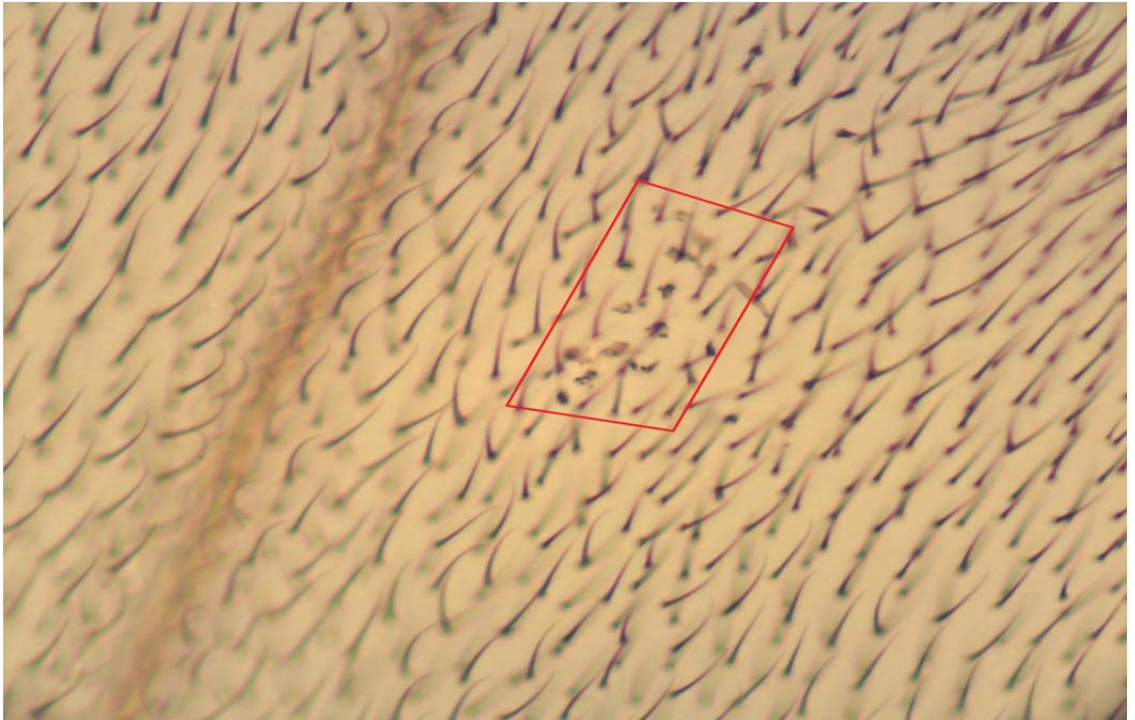
Şekil 4.5. Normal genetik özelliğe sahip bireylerdeki kanat kılları (10x40)



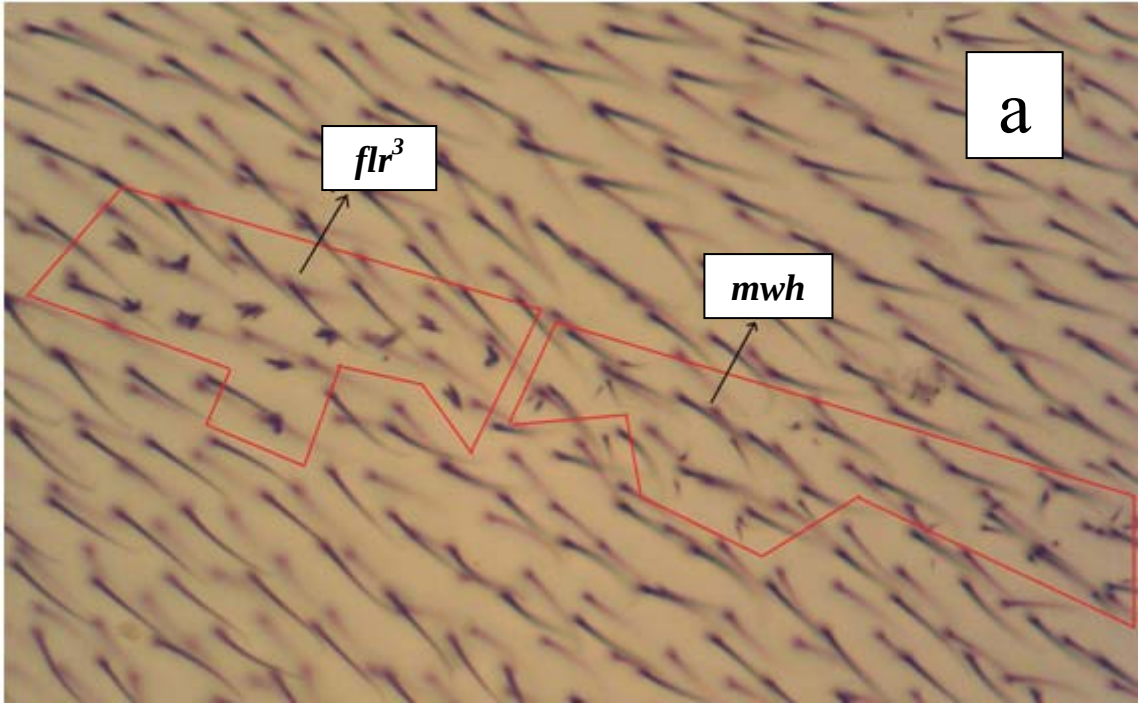
Şekil 4.6. Küçük tek tip *mwh* mutant klon (10x40)



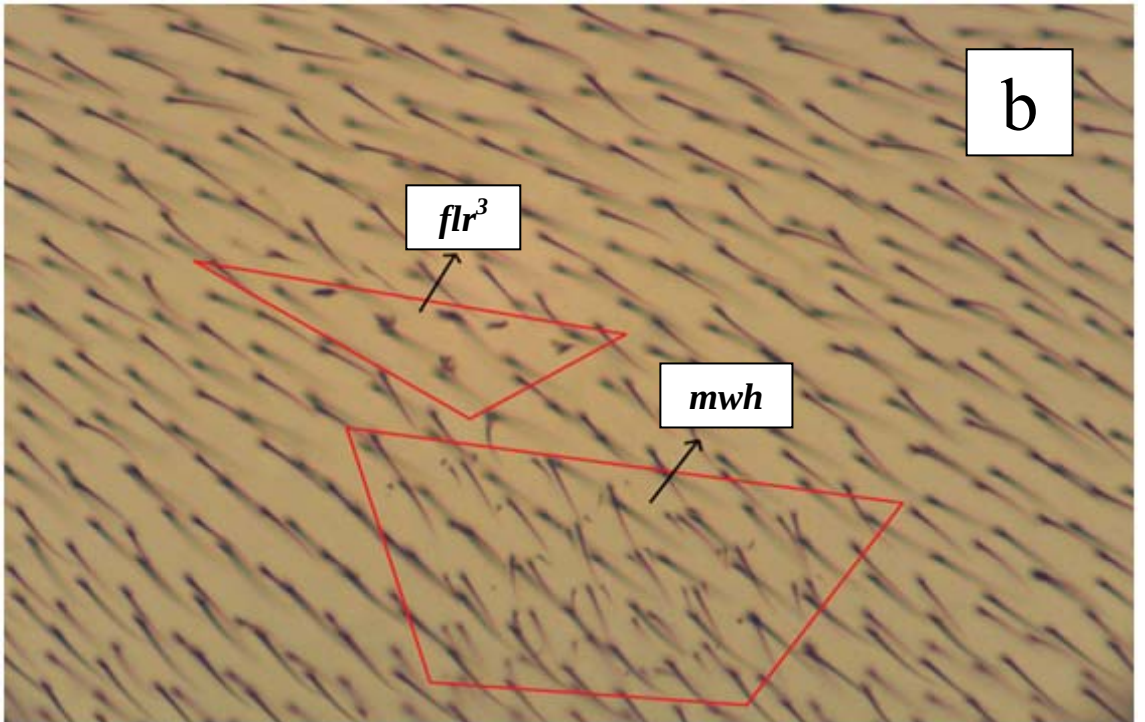
Şekil 4.7. Büyük tek tip *mwh* mutant klon (10x40)



Şekil 4.8. Büyük tek tip *flr*³ mutant klon (10x40)



Şekil 4.9.a flr^3 ve mwh mutant klonları birlikte taşıyan ikiz klon (10x40)



Şekil 4.9.b flr^3 ve mwh mutant klonları birlikte taşıyan ikiz klon (10x40)

4.2.1. Etil metansülfonat (EMS) uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmalarımızda literatür bilgileri doğrultusunda pozitif kontrol grubu olarak seçilen EMS'nin 1mM konsantrasyonu kullanılmıştır. Seçilen bu konsantrasyonun daha üzerindeki uygulamalarda toksik etkinin son derece yüksek olduğu ve hiç canlı birey elde edilemediği gözlenmiştir. Bu nedenle kanat preparatlarının hazırlanabilmesi için 1mM EMS uygulamasında hem yeterli sayıda yaşayabilen birey elde edilmiş hem de genotoksik etki gözlenmiştir.

SMART ile elde edilen bulgular incelendiği zaman, EMS uygulama grubuna ait larvalardan gelişen ergin bireylerin kanatlarında tüm klon tiplerinde kontrol grubuna göre sayısal olarak artış gözlenmiştir. Kontrol grubunun normal kanat fenotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,15; 0,03; 0,01; 0,18 ve 0,19 iken bu oranlar EMS uygulama grubunda sırasıyla 0,61; 0,38; 0,24; 1,05 ve 1,23 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Serrat kanat fenotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,11; 0,01; 0,13 ve 0,13 iken EMS pozitif kontrol grubunda bu oranların 0,56; 0,27; 0,81 ve 0,81'e kadar yükseldiği belirlenmiştir. Klon frekanslarında gözlemlenen tüm bu artışlar istatistiksel olarak pozitif (+) sonuç vermiştir. Serrat kanat fenotipinde *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında *flr*³ mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir (Çizelge 4.2).

Ayrıca Çizelge 4.2 incelendiğinde normal kanat fenotipinde kontrol grubuna ait KİF değeri 0,71 iken bu değer EMS uygulama grubunda 4,30'a, serrat kanat fenotipinde ise bu değer 0,51'den 3,32'ye çıktığı görülmektedir. Tüm bu verilerden EMS'nin *D. melanogaster*'de oldukça yüksek bir genotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.2. EMS uygulaması sonucunda *Drosophila* kanat benek testi ile elde edilen bulgular

Uygulama Grupları (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) ($m = 2$)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) ($m = 5$)			İkiz klon ($m = 5$)			Toplam mwh klon ($m = 2$)			Toplam klon ($m = 2$)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10^5 hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
NORMAL KANAT (mwh/flr^3)																	
Kontrol	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,18)		15	(0,19)		0,71
1 EMS	80	49	(0,61)	+	30	(0,38)	+	19	(0,24)	+	84	(1,05)	+	98	(1,23)	+	4,30
SERRAT KANAT ($mwh/TM3$)																	
Kontrol	80	9	(0,11)		1	(0,01)		*			10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
1 EMS	80	44	(0,56)	+	21	(0,27)	+				65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,32

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler 1995), +: pozitif; -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü, *: *TM3* dengeleyici kromozomunun varlığında *flr³* mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

4.2.2. Metilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkilerini araştırdığımız maddelerden birincisi metilparaben'dir. SMART ile elde edilen bulgular incelendiğinde, farklı konsantrasyonlarda (100mM, 150mM, 200mM ve 250mM) metilparaben uygulaması sonucunda oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon tiplerinin tümünde sayısal olarak artış gözleendiği ancak bu artışların istatistiksel olarak önemsiz (i) olduğu görülmektedir ($p>0,05$).

Kontrol grubunun normal kanat fenotipinde küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,15; 0,03; 0,01; 0,18 ve 0,19 iken bu oranlar en yüksek metilparaben uygulama grubunda (250mM) sırasıyla 0,18; 0,08; 0,01; 0,25 ve 0,26 olarak belirlenmiştir. Serrat kanat fenotipinde ise küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,11; 0,01; 0,13 ve 0,13 iken 250mM metilparaben uygulama grubunda bu oranların 0,56; 0,27; 0,81 ve 0,81'e yükseldiği belirlenmiştir. Ancak klon sayısındaki bu artışların istatistiksel olarak hiçbir uygulama grubunda pozitif değer kazanmadığı negatif (-) ya da önemsiz sonuç (i) verdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3'de KİF değerleri incelendiğinde normal kanat fenotipinde ilk uygulama grubu hariç (100mM) diğer tüm uygulama gruplarında kontrol grubuna göre artış olduğu ve bu değerlerin 0,61; 0,76; 0,92 ve en yüksek uygulama grubu olan 250mM'da 1,02 olduğu bulunmuştur. Serrat kanat fenotipinde ise KİF değerleri sadece son iki uygulama grubu olan 200 ve 250mM uygulama gruplarında 0,56 ve 0,61 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler kontrol grubu için 0,51 olan KİF değerine göre artış göstermiştir. Ancak bu artış istatistiksel olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsizdir.

Metilparaben uygulaması sonucu normal kanat ve serrat kanatlarda meydana gelen tüm klonlardan elde edilen veriler incelendiği zaman, bu maddenin konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etkili olduğu (Şekil 4.1-4.4 ve Çizelge 4.1) ancak genotoksik etki göstermediği (Çizelge 4.3) anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.3. Farklı konsantrasyonlarda metilparaben uygulaması sonucunda *Drosophila* kanat benek testi ile elde edilen bulgular

Uygulama Grupları (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
NORMAL KANAT (mwh/flr ³)																	
Kontrol	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,18)		15	(0,19)		0,71
1 EMS	80	49	(0,61)	+	30	(0,38)	+	19	(0,24)	+	84	(1,05)	+	98	(1,23)	+	4,30
100	80	10	(0,13)	-	2	(0,03)	i	0	(0,00)	i	12	(0,15)	-	12	(0,15)	-	0,61
150	80	11	(0,14)	-	2	(0,03)	i	2	(0,03)	i	15	(0,19)	i	15	(0,19)	i	0,76
200	80	14	(0,18)	i	4	(0,05)	i	2	(0,03)	i	18	(0,23)	i	20	(0,25)	i	0,92
250	80	14	(0,18)	i	6	(0,08)	i	1	(0,01)	i	20	(0,25)	i	21	(0,26)	i	1,02
SERRAT KANAT (mwh/TM3)																	
Kontrol	80	9	(0,11)		1	(0,01)		*			10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
1 EMS	80	44	(0,56)	+	21	(0,27)	+				65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,32
100	80	7	(0,09)	-	0	(0,00)	i				7	(0,09)	-	7	(0,09)	-	0,35
150	80	8	(0,10)	i	0	(0,00)	i				8	(0,10)	-	8	(0,10)	-	0,40
200	80	10	(0,13)	i	1	(0,01)	i				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
250	80	9	(0,11)	i	3	(0,04)	i				12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,61

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü,

*: TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında *flr³* mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

4.2.3. Propilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkili olup olmadığını araştırdığımız maddelerden ikincisi propilparaben'dir. 100mM, 150mM, 200mM ve 250mM olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda propilparaben uygulaması sonucunda oluşan hem normal hem de serrat kanat fenotipine ait klon frekansları ve bu verilerin kontrol grubuyla istatistiksel olarak karşılaştırılması Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.4'te görüldüğü gibi normal kanat fenotipinde propilparaben uygulaması sonrasında oluşan küçük tek tip klon tipinde en düşük uygulama grubu (100mM) hariç tüm uygulama gruplarında sayısal olarak artış gözlenmiştir. Bu artışlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$). Serrat kanat fenotipinde ise sadece 250mM'lık uygulama grubunda sayısal artış gözlenmiş ancak bu artış da istatistiksel olarak önemsiz (i) bulunmuştur. Toplam *mwh* ve toplam klon frekansları incelendiğinde ise normal kanatlarda sadece 200 ve 250mM'lık uygulama gruplarında, serrat kanatlarda ise sadece 250mM'lık uygulama grubunda sayısal artış gözlenmiştir. Kontrol grubunun normal kanat fenotipinde toplam *mwh* ve toplam klon frekansları sırasıyla 0,18 ve 0,19 iken bu oranlar en yüksek propilparaben uygulama grubunda (250mM) sırasıyla 0,29 ve 0,31 olarak belirlenmiştir. Serrat kanat fenotipinde ise hem toplam *mwh* hem de toplam klon frekansları kontrol grubu için 0,13 iken, 250mM propilparaben uygulama grubunda 0,18 olarak tespit edilmiştir.

Propilparaben uygulama grubunda da tıpkı metilparabende olduğu gibi klon sayısı ve konsantrasyon artışı arasında pozitif bir korelasyon gözlenmekle birlikte bu artışlar istatistiki olarak $p>0,05$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Uygulama grupları hem normal hem de serrat kanat fenotipi için önemsiz (i) ya da negatif (-) sonuç vermiştir (Çizelge 4.4). Elde edilen tüm veriler incelendiğinde, propilparabenin de konsantrasyon artışına bağlı olarak toksik etki gösterdiği (Şekil 4.1-4.4 ve Çizelge 4.1) ancak genotoksik etkili olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Farklı konsantrasyonlarda propilparaben uygulaması sonucunda *Drosophila* kanat benek testi ile elde edilen bulgular

Uygulama Grupları (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (<i>m</i> = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (<i>m</i> = 5)			İkiz klon (<i>m</i> = 5)			Toplam <i>mwh</i> klon (<i>m</i> = 2)			Toplam klon (<i>m</i> = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	No	Fr.	<i>D</i>	
NORMAL KANAT (<i>mwh/flr</i> ³)																	
Kontrol	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,18)		15	(0,19)		0,71
1 EMS	80	49	(0,61)	+	30	(0,38)	+	19	(0,24)	+	84	(1,05)	+	98	(1,23)	+	4,30
100	80	9	(0,11)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	12	(0,15)	-	12	(0,15)	-	0,61
150	80	13	(0,16)	i	0	(0,00)	-	1	(0,01)	i	14	(0,18)	i	14	(0,18)	i	0,71
200	80	18	(0,23)	i	4	(0,05)	i	2	(0,03)	i	20	(0,25)	i	24	(0,30)	i	1,02
250	80	20	(0,25)	i	3	(0,04)	i	2	(0,03)	i	23	(0,29)	i	25	(0,31)	i	1,17
SERRAT KANAT (<i>mwh/TM3</i>)																	
Kontrol	80	9	(0,11)		1	(0,01)		*			10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
1 EMS	80	44	(0,56)	+	21	(0,27)	+				65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,32
100	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	i				9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
150	80	7	(0,09)	-	1	(0,01)	i				8	(0,10)	-	8	(0,10)	-	0,40
200	80	8	(0,10)	i	2	(0,03)	i				10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
250	80	11	(0,14)	i	3	(0,04)	i				14	(0,18)	i	14	(0,18)	i	0,71

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würzler 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü,

*: TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında *flr³* mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

4.2.4. Bütilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkilerini araştırdığımız maddelerden üçüncüsü bütilparaben olup 4 farklı konsantrasyonda uygulanması sonucu elde edilen SMART verileri Çizelge 4.5’de gösterilmiştir.

Bütilparaben uygulaması sonrasında normal kanat fenotipinde oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yalnızca kontrol grubu için 0,03 olan büyük tek tip klon frekansının 250mM uygulama grubunda 0,04 olduğu tespit edilmiştir. Diğer klon frekanslarında ise herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. Bu değerlere göre kontrol ve deney grupları arasında ya negatif (-) ya da önemsiz (i) fark vardır. Serrat kanat fenotipinde ise özellikle 200 ve 250mM’lık uygulama grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında küçük tek tip klon frekansının 0,11’den 0,15’e; toplam *mwh* klon frekansının ve toplam klon frekansının da 0,13’den 0,16’ya yükseldiği görülmüştür. Ancak bu da istatistiksel olarak önemsiz (i) bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5’de normal kanat fenotipi için klon indüksiyon frekansı sütunu incelendiği zaman, 10^5 hücre başına 0,71 olan KİF değerinin en yüksek uygulama gruplarında (200 ve 250mM) değişmediği; serrat kanat fenotipinde ise bu frekansın kontrol grubunda 0,51 iken aynı uygulama grupları (200 ve 250 mM) için 0,56 ve 0,66’ya kadar yükseldiği tespit edilmiştir.

Bütilparaben uygulaması sonucu elde edilen tüm veriler incelendiği zaman, bu maddenin konsantrasyon artışına bağlı olarak metilparaben ve propilparaben kadar olmasa da toksik etkili olduğu (Şekil 4.1-4.4 ve Çizelge 4.1) ancak genotoksik etkinin olmadığı (Çizelge 4.5) belirlenmiştir.

Çizelge 4.5. Farklı konsantrasyonlarda bütülpaben uygulaması sonucunda *Drosophila* kanat benek testi ile elde edilen bulgular

Uygulama Grupları (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
NORMAL KANAT (mwh/flr ³)																	
Kontrol	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,18)		15	(0,19)		0,71
1 EMS	80	49	(0,61)	+	30	(0,38)	+	19	(0,24)	+	84	(1,05)	+	98	(1,23)	+	4,30
100	80	9	(0,11)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	10	(0,13)	-	10	(0,13)	-	0,51
150	80	8	(0,10)	-	1	(0,01)	i	1	(0,01)	i	10	(0,13)	-	10	(0,13)	-	0,51
200	80	12	(0,15)	i	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	14	(0,18)	i	15	(0,19)	i	0,71
250	80	11	(0,14)	i	3	(0,04)	i	0	(0,00)	i	14	(0,18)	i	14	(0,18)	i	0,71
SERRAT KANAT (mwh/TM3)																	
Kontrol	80	9	(0,11)		1	(0,01)		*			10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
1 EMS	80	44	(0,56)	+	21	(0,27)	+				65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,32
100	80	9	(0,11)	i	0	(0,00)	i				9	(0,11)	i	9	(0,11)	i	0,46
150	80	10	(0,13)	i	0	(0,00)	i				10	(0,13)	i	10	(0,13)	i	0,51
200	80	10	(0,13)	i	1	(0,01)	i				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
250	80	12	(0,15)	i	1	(0,01)	i				13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,66

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würgler 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü,

*: TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında *flr³* mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: $\alpha=\beta=0,05$

4.2.5. Etilparaben uygulaması sonucu SMART ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda genotoksik etkilerini araştırdığımız maddelerin sonuncusu etilparaben'dir. Etilparaben uygulaması sonrasında normal kanat fenotipi için, kontrol ve uygulama grupları birbiriyle karşılaştırıldığı zaman, kullanılan konsantrasyonların hiçbirisinde incelenen klon tiplerine ait herhangi bir artış olmamıştır. Yalnızca serrat kanat fenotipinde özellikle 200 ve 250mM'lık uygulama gruplarında küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon frekanslarında küçük bir artış gözlenmiştir. Şöyle ki küçük tek tip 0,11'den 0,14'e, toplam *mwh* ve toplam klon frekansı da 0,13'den 0,15'e yükselmiştir. Ancak bu artış da istatistiksel olarak önemsiz (i) bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Etilparabene bağlı olarak ne normal ne de serrat kanat fenotipinde genotoksik etkinin göstergesi olan pozitif (+) fark gözlenmemiştir. İncelenen klon tiplerinin tümünde istatistiki olarak ya negatif (-) ya da önemsiz (i) fark bulunmuştur. Bu durum Çizelge 4.6'da klon indüksiyon frekansı sütununda da görülmektedir. Etilparaben uygulama gruplarında hem normal hem de serrat kanat fenotipinde, tüm klon tiplerinden elde edilen verilere göre hesaplanan KİF değerleri normal kanat fenotipinde negatif kontrol grubunda 0,71 iken etilparaben uygulama grubunda sırasıyla 0,25; 0,25; 0,51 ve 0,66; serrat kanat fenotipinde ise kontrol grubunda 0,51 iken uygulama gruplarında sırasıyla 0,30; 0,40; 0,56 ve 0,61 olarak tespit edilmiştir.

Larvaların hayatta kalış oranlarına (larvadan ergine gelişebilen bireylerin) ve onlardan gelişen ergin bireylerin kanatlarının çeşitli klonlar bakımından incelenmesinden sonra parabenlerin toksisite sıralamasının propilparaben > metilparaben > bütilparaben > etilparaben şeklinde olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı konsantrasyonlarda etilparaben uygulaması sonucunda *Drosophila* kanat benek testi ile elde edilen bulgular

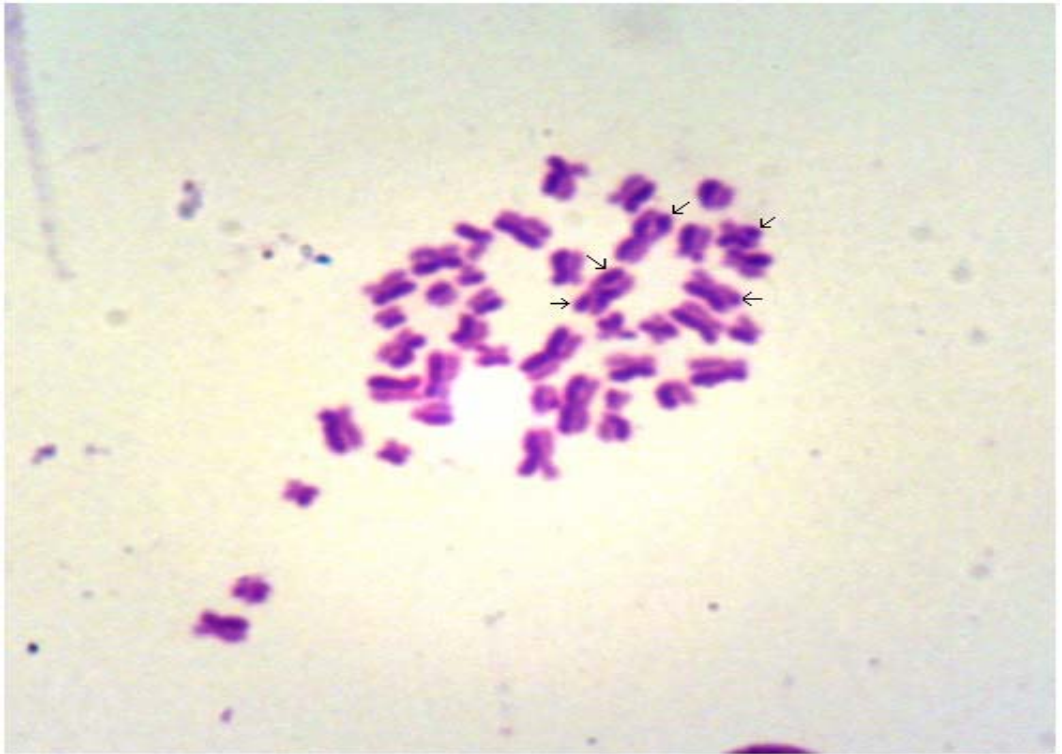
Uygulama Grupları (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klon (1–2 hücre) (m = 2)			Büyük tek tip klon (>2 hücre) (m = 5)			İkiz klon (m = 5)			Toplam mwh klon (m = 2)			Toplam klon (m = 2)			Klon indüksiyon frekansı (KİF) (10 ⁵ hücre)
		No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	No	Fr.	D	
NORMAL KANAT (mwh/flr ³)																	
Kontrol	80	12	(0,15)		2	(0,03)		1	(0,01)		14	(0,18)		15	(0,19)		0,71
1 EMS	80	49	(0,61)	+	30	(0,38)	+	19	(0,24)	+	84	(1,05)	+	98	(1,23)	+	4,30
100	80	4	(0,05)	-	1	(0,01)	i	0	(0,00)	i	5	(0,06)	-	5	(0,06)	-	0,25
150	80	4	(0,05)	-	1	(0,01)	i	1	(0,01)	i	5	(0,06)	-	6	(0,08)	-	0,25
200	80	8	(0,10)	-	2	(0,03)	i	1	(0,01)	i	10	(0,13)	-	11	(0,14)	-	0,51
250	80	11	(0,14)	i	2	(0,03)	i	0	(0,00)	i	13	(0,16)	i	13	(0,16)	i	0,66
SERRAT KANAT (mwh/TM3)																	
Kontrol	80	9	(0,11)		1	(0,01)		*			10	(0,13)		10	(0,13)		0,51
1 EMS	80	44	(0,56)	+	21	(0,27)	+				65	(0,81)	+	65	(0,81)	+	3,32
100	80	6	(0,08)	-	0	(0,00)	i				6	(0,08)	-	6	(0,08)	-	0,30
150	80	8	(0,10)	i	0	(0,00)	i				8	(0,10)	-	8	(0,10)	-	0,40
200	80	10	(0,13)	i	1	(0,01)	i				11	(0,14)	i	11	(0,14)	i	0,56
250	80	11	(0,14)	i	1	(0,01)	i				12	(0,15)	i	12	(0,15)	i	0,61

No: Klon sayısı, Fr: Frekans, D: İstatistik sonuçların gösterimi (Frei and Würglers 1995), +: pozitif, -: negatif, i: önemsiz fark, m: çarpım faktörü,

*: TM3 dengeleyici kromozomunun varlığında flr³ mutasyonu oluşmadığından ikiz klon meydana gelmemektedir. Olasılık düzeyi: α=β=0,05

4.3. Kardeş Kromatid Değişimi (KKD) Testi ile Elde Edilen Bulgular

Dört farklı donörden alınan kanlarla hazırlanan periferik kan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 μ g/mL) paraben (metil, propil, etil ve bütülpaben) ve EMS uygulaması sonucu elde edilen kardeş kromatid değişimi (KKD) frekansları ve replikasyon indeksi (Rİ) verileri Çizelge 4.7-4.10'da sunulmuştur. Ayrıca tüm uygulama gruplarının negatif kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu oluşan istatistiksel veriler de aynı çizelgelerde verilmiştir. KKD frekansları tespit edilirken, her bir donörden 25 adet olmak üzere toplam 100 adet ikinci mitozu geçirmiş metafaz plağı incelenmiştir. Rİ için ise her bir donörden rastgele seçilmiş 100 adet olmak üzere toplam 400 metafaz plağı incelenmiş ve ortalama Rİ değeri hesaplanmıştır. Ayrıca ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin kromozomlarının mikroskopik incelemeleri sırasında elde edilen kardeş kromatid değişimlerine ait fotoğraflar, Şekil 4.10-4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.10. İnsan periferik lenfositlerinde distile su kontrol grubuna ait kardeş kromatid değişimi (10x100)



Şekil 4.11. İnsan periferel lenfositlerinde EMS uygulama grubuna ait kardeş kromatid değişimi (10x100)



Şekil 4.12. İnsan periferel lenfositlerinde paraben uygulama grubuna ait kardeş kromatid değişimi (10x100)

4.3.1. Metilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular

İnsan periferik lenfosit hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) metilparaben uygulaması sonucu elde edilen ortalama KKD miktarları sırasıyla $4,66\pm0,48$; $4,75\pm0,44$; $4,80\pm0,52$ ve $4,89\pm0,61$ iken, bu oranların pozitif kontrol grubunda $25,96\pm2,31$ negatif kontrol grubunda ise $4,68\pm0,46$ olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). İkinci mitozu geçirmiş metafaz plakları içerisindeki minimum-maksimum KKD frekanslarına bakıldığında en yüksek frekansın 8-36 ile EMS pozitif kontrol grubuna ait olduğu görülmektedir (Şekil 4.11). En düşük minimum-maksimum KKD frekansına ise 0-6 ile negatif kontrol grubunda rastlanmıştır. Uygulama gruplarında ise bu değer, 125µg/mL metilparaben uygulama grubunda 0-7 ve 1000µg/mL uygulama grubunda 4-9 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.10).

Çizelge 4.7 incelendiği zaman, en düşük konsantrasyona sahip metilparaben uygulama grubu (125µg/mL) dışında tüm uygulama gruplarında ortalama KKD frekansının artmasına rağmen bu sonuçların negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0,01$). Sadece EMS pozitif kontrol grubundan elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

Çalışmamızda, mitoz 1, mitoz 2 ve mitoz 3'ü geçiren metafaz plağı sayılarının hesaplanmasıyla elde edilen replikasyon indeksi (Rİ) değeri parabenlerin sitotoksik olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Bu hesaplamada sitotoksik etki gösteren paraben uygulama gruplarında, mitoz 1 (M₁)'de kalıp mitoz 2 (M₂) ve mitoz 3 (M₃)'e geçemeyen metafaz plaklarının sayısal olarak artış gösterdiği görülmüştür. Çizelge 4.7'de metilparabenin Rİ üzerine etkisi incelendiği zaman, en düşük konsantrasyona sahip metilparaben uygulama grubu (125µg/mL) dışında tüm gruplarda düşüşün olduğu görülmüştür. Şöyle ki, Rİ oranları metilparaben uygulama gruplarında sırasıyla $2,48\pm0,36$; $2,38\pm0,40$; $2,32\pm0,18$ ve $2,24\pm0,29$ iken, pozitif kontrol grubunda bu oran $2,25\pm0,21$, negatif kontrol grubunda ise $2,41\pm0,18$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7). Elde edilen tüm Rİ değerleri negatif kontrol grubuyla istatistiki olarak karşılaştırıldığında hiçbir uygulama grubunda sonuç anlamlı bulunmamıştır ($p>0,01$).

Çizelge 4.7. Farklı konsantrasyonlarda metilparaben uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (µg/mL)	Min.-Max. KKD	Ortalama KKD Sayısı ±S.H.	M ₁	M ₂	M ₃	Replikasyon İndeksi (Rİ) ±S.H.
Distile su	-	0-6	4,68±0,46	58	118	224	2,41±0,18
EMS	0,7	8-36	25,96±2,31*	80	140	180	2,25±0,21
Metilparaben	125	0-7	4,66±0,48	50	110	240	2,48±0,36
	250	1-8	4,75±0,44	64	122	214	2,38±0,40
	500	3-7	4,80±0,52	61	150	189	2,32±0,18
	1000	4-9	4,89±0,61	90	124	186	2,24±0,29

KKD:Kardeş kromatid değişimi; S.H.:Standart hata; Min:Minimum; Max:Maksimum; M₁:Mitoz 1; M₂:Mitoz 2; M₃:Mitoz 3; *:Gruplar arasındaki fark p<0,01 düzeyinde önemlidir.

4.3.2. Propilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular

Çalışmamızda kullandığımız parabenlerden bir diğeri olan propilparabenin insan periferik lenfosit hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) uygulanması sonucunda elde edilen ortalama KKD miktarları sırasıyla 4,69±0,61; 4,77±0,61; 4,81±0,66 ve 5,04±0,70 iken bu oranlar pozitif kontrol grubunda 25,96±2,31, negatif kontrol grubunda ise 4,68±0,46 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). İkinci mitozu geçirmiş metafaz plakları içerisindeki KKD frekanslarına bakıldığında en yüksek minimum-maksimum KKD oranına 8-36 ile EMS pozitif kontrol grubunda rastlanmıştır. Bununla birlikte pozitif kontrol grubunu, 4-13'lük oranla en yüksek konsantrasyondaki (1000µg/mL) propilparaben uygulama grubunun izlediği belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8 incelendiği zaman, propilparabenin tüm konsantrasyonlarda KKD frekansını artırdığı gözükmemektedir. Ancak bu artışın tüm propilparaben uygulama

grupları için negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz ($p>0,01$) olduğu, sadece EMS uygulama grubunun anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir ($p<0,01$).

Propilparabenin sitotoksik etkisini belirlemek amacıyla hesapladığımız replikasyon indeksi (Rİ) oranları incelendiğinde, propilparabenin uygulanan tüm konsantrasyonlarda negatif kontrol grubuna göre, 1. mitozda kalan metafaz plağı sayısını artırarak 3. mitozda geçebilen metafaz plağı sayısını ve dolayısıyla Rİ oranını düşürdüğü ve sitotoksik etkinin gözlemlendiği belirlenmiştir (Çizelge 4.8). Rİ oranları propilparaben uygulama gruplarında sırasıyla $2,39\pm0,44$; $2,31\pm0,25$; $2,26\pm0,25$ ve $1,91\pm0,12$ iken, EMS pozitif kontrol grubunda bu oran $2,25\pm0,21$, negatif kontrol grubunda ise $2,41\pm0,18$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Propilparaben uygulaması sonucu elde edilen Rİ oranları, negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece son konsantrasyonda ($1000\mu\text{g/mL}$) elde edilen farkın anlamlı ($p>0,01$) olduğu, EMS grubu da dahil diğer tüm uygulama gruplarından elde edilen farkların ise önemsiz olduğu ($p<0,01$) belirlenmiştir.

Çizelge 4.8. Farklı konsantrasyonlarda propilparaben uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Min.-Max. KKD	Ortalama KKD Sayısı $\pm\text{S.H.}$	M ₁	M ₂	M ₃	Replikasyon İndeksi (Rİ) $\pm\text{S.H.}$
Distile su	-	0-6	$4,68\pm0,46$	58	118	224	$2,41\pm0,18$
EMS	0,7	8-36	$25,96\pm2,31^*$	80	140	180	$2,25\pm0,21$
Propilparaben	125	1-5	$4,69\pm0,61$	74	96	230	$2,39\pm0,44$
	250	1-8	$4,77\pm0,61$	59	158	183	$2,31\pm0,25$
	500	3-7	$4,81\pm0,66$	76	144	180	$2,26\pm0,25$
	1000	4-13	$5,04\pm0,70$	155	126	119	$1,91\pm0,12^*$

KKD:Kardeş kromatid değişimi; S.H.:Standart hata; Min:Minimum; Max:Maksimum; M₁:Mitoz 1; M₂:Mitoz 2; M₃:Mitoz 3; *:Gruplar arasındaki fark $p<0,01$ düzeyinde önemlidir.

4.3.3. Bütılparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular

Farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) bütılparaben uygulaması sonucunda elde edilen ortalama KKD frekansları sırasıyla $4,65\pm0,36$; $4,71\pm0,42$; $4,70\pm0,48$ ve $4,77\pm0,56$ iken, bu oranlar pozitif kontrol grubunda $25,96\pm2,31$, negatif kontrol grubunda ise $4,68\pm0,46$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Ayrıca Çizelge 4.9’da minimum-maksimum KKD frekansı oranlarına baktığımızda en yüksek frekans aralığının 8-36 ile EMS uygulama grubuna, en düşük frekans aralığının ise 0-6 ile distile su kontrol grubuna ve bütılparabenin 125µg/mL uygulama grubuna ait olduğu görülmektedir. Uygulama grupları içinde en yüksek KKD frekansı 3-7 ile 1000µg/mL grubunda gözlenmiştir.

Çizelge 4.9 incelendiği zaman, bütılparabenin en düşük konsantrasyonlu (125µg/mL) uygulama grubu hariç tüm konsantrasyonlarda KKD frekansını arttırdığı görülmüştür. Ancak uygulama grupları ve EMS pozitif kontrol grubundan elde edilen verilerle negatif kontrol grubuna ait veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldığı zaman, sadece EMS uygulama grubundan elde edilen sonucun $p<0,01$ düzeyinde anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.9’da bütılparabenin Rİ üzerine etkisi incelendiği zaman, 125 ve 250µg/mL’lik uygulama grupları hariç diğer tüm gruplarda negatif kontrol grubuna göre düşüşün olduğu ve sitotoksik etkinin gözlemlendiği tespit edilmiştir. Bu düşüşün 1. mitozda kalan metafaz plağı sayısının artıp 3. mitozu geçiren metafaz plağı sayısının düşmesinden kaynaklandığı belirlenmiştir. Rİ oranları bütılparaben uygulama gruplarında sırasıyla $2,45\pm0,35$; $2,41\pm0,31$; $2,33\pm0,23$ ve $2,28\pm0,33$ iken, pozitif kontrol grubunda bu oran $2,25\pm0,21$, negatif kontrol grubunda ise $2,41\pm0,18$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.9). Ayrıca, uygulama grupları için elde edilen tüm Rİ değerleri negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman sonuçların tüm uygulama gruplarında istatistiki olarak önemsiz ($p>0,01$) olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.9. Farklı konsantrasyonlarda bütilparaben uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (µg/mL)	Min.-Max. KKD	Ortalama KKD Sayısı ±S.H.	M ₁	M ₂	M ₃	Replikasyon İndeksi (Rİ) ±S.H.
Distile su	-	0-6	4,68±0,46	58	118	224	2,41±0,18
EMS	0,7	8-36	25,96±2,31*	80	140	180	2,25±0,21
Bütilparaben	125	0-6	4,65±0,36	59	101	240	2,45±0,35
	250	2-6	4,71±0,42	52	131	217	2,41±0,31
	500	1-8	4,70±0,48	64	140	196	2,33±0,23
	1000	3-7	4,77±0,56	79	130	191	2,28±0,33

KKD:Kardeş kromatid değişimi; S.H.:Standart hata; Min:Minimum; Max:Maksimum; M₁:Mitoz 1; M₂:Mitoz 2; M₃:Mitoz 3; *:Gruplar arasındaki fark p<0,01 düzeyinde önemlidir.

4.3.4. Etilparaben uygulaması sonucu KKD testi ile elde edilen bulgular

Çalışmalarımızda kullandığımız parabenlerden sonuncusu olan etilparabenin hazırlanan periferik kan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) uygulanması sonucunda elde edilen ortalama KKD frekansları sırasıyla 2,55±0,35; 2,46±0,29; 2,48±0,24 ve 2,39±0,38 iken bu oranlar pozitif kontrol grubunda 25,96±2,31, negatif kontrol grubunda ise 4,68±0,46 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Bununla birlikte minimum-maksimum KKD frekanslarına bakıldığı zaman, en yüksek frekans aralığının EMS uygulama grubunda (8-36), en düşük frekans aralığının (0-5) ise etilparaben uygulama grubunun 125µg/mL’lik konsantrasyonuna ait olduğu (Çizelge 4.10) belirlenmiştir. Etilparabenin en yüksek uygulama grubu olan 1000µg/mL’de ise bu aralık 1-7 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.10 incelendiği zaman, etilparaben uygulama grubunun en yüksek konsantrasyonu (1000µg/mL) hariç tüm uygulama gruplarında KKD frekansında artışın

olduğu gözükmemektedir. Ancak yapılan istatistiki hesaplamalar sonucunda EMS pozitif kontrol grubu hariç diğer tüm uygulama gruplarından elde edilen verilerin istatistiksel olarak önemsiz olduğu görülmüştür ($p>0,01$).

Ayrıca Çizelge 4.10'da Rİ verileri incelendiğinde, etilparabenin en yüksek konsantrasyonu (1000µg/mL) hariç ilk üç uygulama grubunda (125, 250 ve 500µg/mL) Rİ oranının kontrol grubuna göre yüksek olduğu düşürücü etkisinin olmadığı ve sitotoksik etkinin oluşmadığı belirlenmiştir. Şöyle ki, Rİ oranları etilparaben uygulama gruplarında sırasıyla 2,55±0,35; 2,46±0,29; 2,48±0,24 ve 2,39±0,38 iken pozitif kontrol grubunda bu oran 2,25±0,21, negatif kontrol grubunda ise 2,41±0,18 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Tüm uygulama gruplarından elde edilen Rİ verilerinin distile su kontrol grubundan elde edilen Rİ değeriyle karşılaştırılması sonucu yine diğer üç paraben uygulama grubunda olduğu gibi, istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir ($p>0,01$).

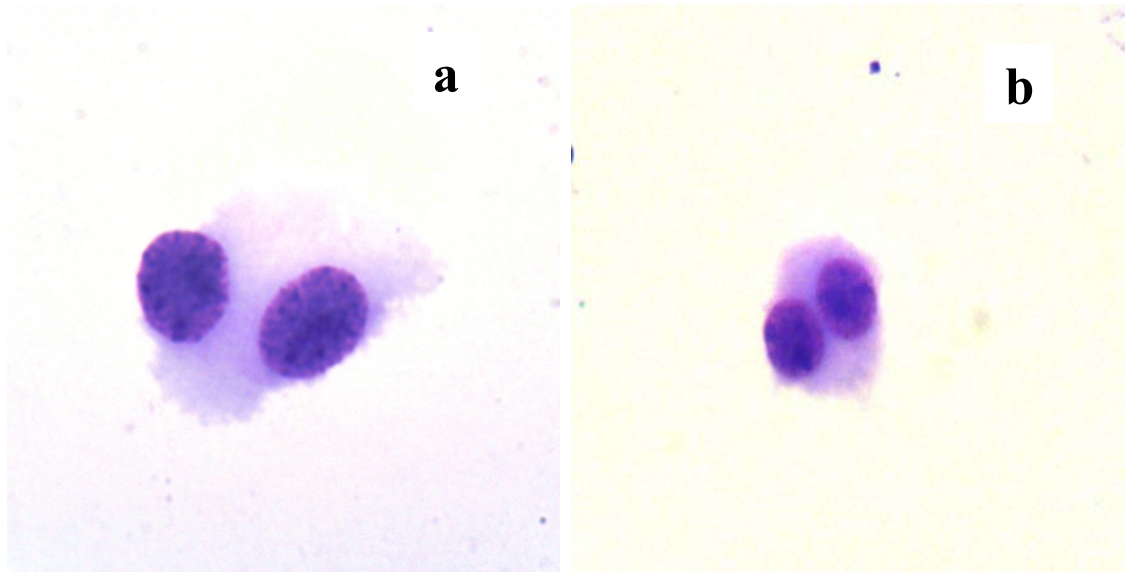
Çizelge 4.10. Farklı konsantrasyonlarda etilparaben uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan KKD ve Rİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (µg/mL)	Min.-Max. KKD	Ortalama KKD Sayısı ±S.H.	M ₁	M ₂	M ₃	Replikasyon İndeksi (Rİ) ±S.H.
Distile su	-	0-6	4,68±0,46	58	118	224	2,41±0,18
EMS	0,7	8-36	25,96±2,31*	80	140	180	2,25±0,21
Etilparaben	125	0-5	4,60±0,33	36	108	256	2,55±0,35
	250	0-7	4,64±0,38	50	116	234	2,46±0,29
	500	1-6	4,68±0,46	49	111	240	2,48±0,24
	1000	1-7	4,70±0,48	50	144	206	2,39±0,38

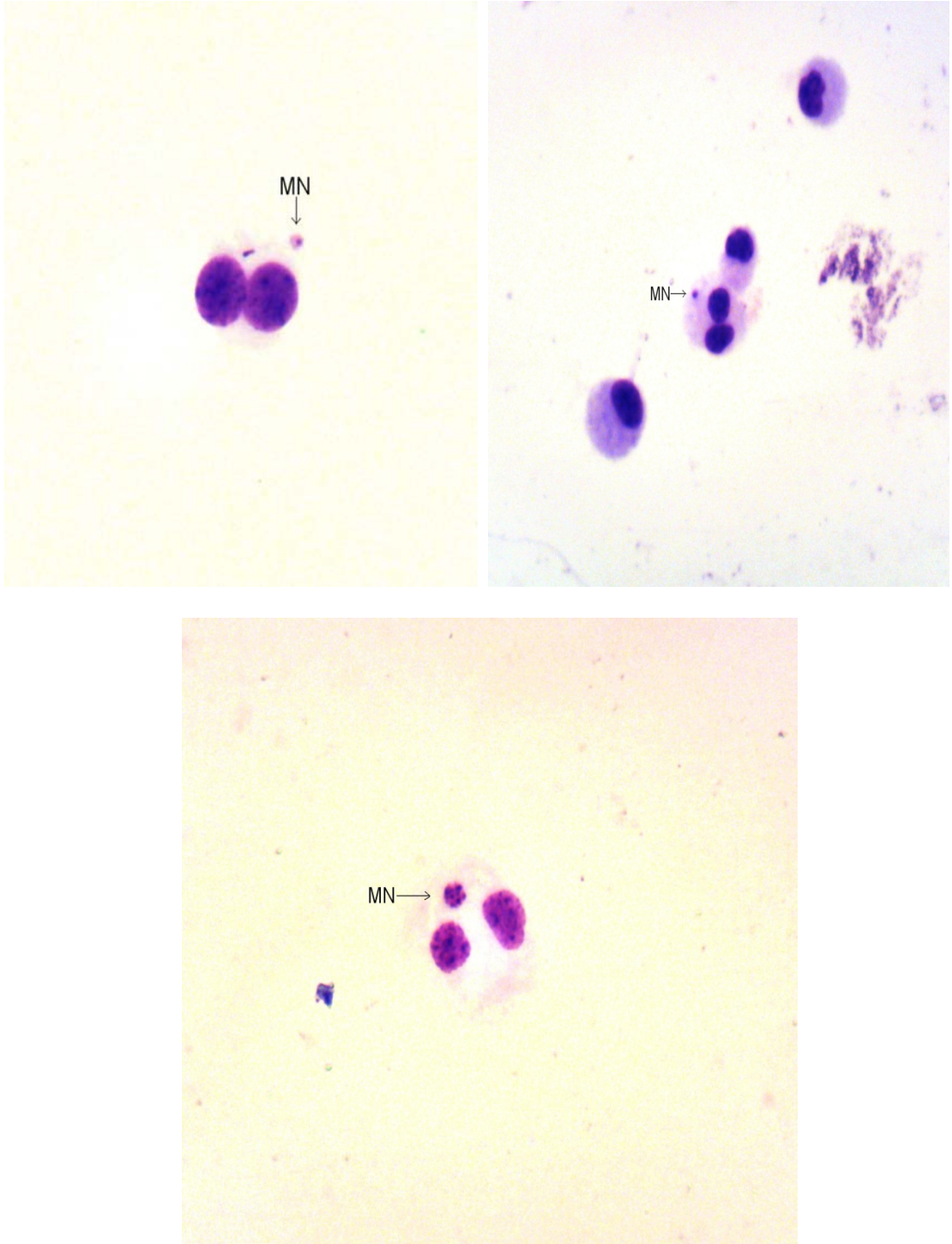
KKD:Kardeş kromatid değişimi; S.H.:Standart hata; Min:Minimum; Max:Maksimum; M₁:Mitoz 1; M₂:Mitoz 2; M₃:Mitoz 3; *:Gruplar arasındaki fark $p<0,01$ düzeyinde önemlidir.

4.4. Mikronükleus (MN) Testi ile Elde Edilen Bulgular

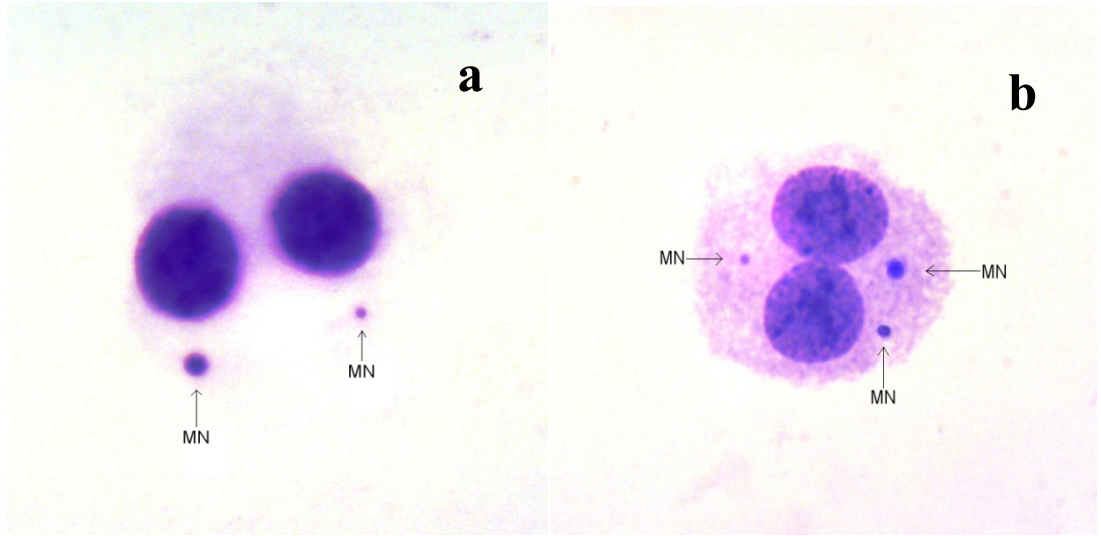
Dört farklı donörden alınan kan ile hazırlanan periferik kan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 μ g/mL) çeşitli paraben (metil, propil, etil ve bütülpaben) ve EMS uygulaması sonucu elde edilen mikronükleus (MN) frekansları ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) verileri Çizelge 4.11-4.14’de sunulmuştur. Ayrıca tüm uygulama gruplarının negatif kontrol grubuyla karşılaştırılması sonucu oluşan istatistiksel veriler de aynı çizelgelerde belirtilmiştir. MN frekansları elde edilirken her bir donörden 1000 adet olmak üzere dört farklı donörden toplam 4000 adet binükleuslu hücre, NBİ için ise her bir donörden rastgele seçilmiş 1000 hücre incelenmiştir. Ayrıca mikroskopik incelemeler sonucunda elde edilen mikronükleus taşımayan binükleuslu hücrelere ait fotoğraflar Şekil 4.13’de, mikronükleus taşıyan binükleuslu hücrelere ait fotoğraflar ise Şekil 4.14 ve 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Mikronükleus taşımayan binükleuslu hücreler; a)10x100, b)10x40 büyütme



Şekil 4.14. Tek mikronükleus (MN) taşıyan binükleuslu hücreler (10x40)



Şekil 4.15. a) Çift mikronükleus (MN) ve b) üç mikronükleus (MN) taşıyan binükleuslu hücreler (10x100)

4.4.1. Metilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular

Farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000 μ g/mL) metilparaben uygulamasıyla elde edilen ortalama MN miktarları sırasıyla 0,225 $\pm$ 0,62; 0,325 $\pm$ 0,62; 0,475 $\pm$ 0,62 ve 0,500 $\pm$ 0,40 iken, bu oranların pozitif kontrol grubunda 2,575 $\pm$ 1,31, negatif kontrol grubunda ise 0,275 $\pm$ 0,62 olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Binükleuslu hücreler içerisinde tespit edilen MN frekanslarında meydana gelen artış aynı zamanda uygulanan maddenin de genotoksik etkisini belirlemektedir. Metilparaben uygulaması sonrası incelenen binükleuslu hücreler içerisindeki MN frekanslarına bakıldığında, sadece EMS pozitif kontrol grubunda 3'lü MN'lar gözlenmiştir. Buna karşın metilparaben uygulama gruplarında ise son iki uygulama grubunda (500 ve 1000 μ g/mL) 2'li, diğer gruplarda (125 ve 250 μ g/mL) ise tekli MN'ların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11 incelendiğinde, en düşük konsantrasyona sahip metilparaben uygulama grubu (125 μ g/mL) dışında tüm uygulama gruplarında (250, 500 ve 1000 μ g/mL) ortalama MN sayısının artmasına rağmen bu sonuçlar negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak $p>0,01$ düzeyinde önemsiz bulunmuştur. Sadece

EMS pozitif kontrol grubundan elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,01$).

Çalışmamızda ayrıca, parabenlerin olası sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla nükleer bölünme indeksi (NBİ) değerleri hesaplanmıştır. Bu değer 1, 2, 3 ve 4 nükleusa sahip hücrelerin sayılıp toplam hücre sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir. Sonuçta sitotoksik etki gösteren paraben uygulama gruplarında 1 nükleuslu hücre sayısının artıp 2, 3 ve 4 nükleuslu hücre sayısının düşüş gösterdiği belirlenmiştir. Çizelge 4.11’de metilparabenin NBİ üzerine etkisi incelendiği zaman, 125 ve 250 $\mu\text{g/mL}$ ’lik uygulama gruplarında negatif kontrol grubuna yakın, 500 ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ ’lik uygulama gruplarında ise negatif kontrol grubundan daha düşük değerler tespit edilmiştir. Şöyle ki, NBİ oranları metilparaben uygulama gruplarında sırasıyla $1,58\pm0,14$; $1,55\pm0,32$; $1,47\pm0,31$ ve $1,44\pm0,18$ iken, pozitif kontrol grubunda bu oran $1,48\pm0,18$, negatif kontrol grubunda ise $1,53\pm0,12$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Elde edilen tüm NBİ değerleri negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiçbir uygulama grubunda sonuç anlamlı bulunmamıştır ($p>0,01$).

Çizelge 4.11. Farklı konsantrasyonlarda metilparaben uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	İncelenen Binükleuslu Hücre Sayısı	Binükleuslu Hücreler İçindeki MN Frekansları			Ortalama MN Sayısı $\pm$ S.H. (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) $\pm$ S.H.
			(1)	(2)	(3)		
Distile su	-	4000	9	1	-	$0,275\pm0,62$	$1,53\pm0,12$
EMS	0,7	4000	71	10	4	$2,575\pm1,31^*$	$1,48\pm0,18$
Metilparaben	125	4000	9	-	-	$0,225\pm0,62$	$1,58\pm0,14$
	250	4000	13	-	-	$0,325\pm0,62$	$1,55\pm0,32$
	500	4000	15	2	-	$0,475\pm0,62$	$1,47\pm0,31$
	1000	4000	18	1	-	$0,500\pm0,40$	$1,44\pm0,18$

MN:Mikronükleus; S.H.:Standart hata; *:Gruplar arasındaki fark $p<0,01$ düzeyinde önemlidir.

4.4.2. Propilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular

Çalışmalarımızda kullandığımız propilparabenin insan periferal lenfosit hücrelerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) uygulanması sonucunda elde edilen ortalama MN miktarları sırasıyla 0,375±1,19; 0,500±0,40; 0,475±0,62 ve 0,525±1,19 iken bu oranlar pozitif kontrol grubunda 2,575±1,31, negatif kontrol grubunda ise 0,275±0,62 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). İncelenen binükleuslu hücreler içerisindeki MN frekanslarına bakıldığında sadece EMS pozitif kontrol grubu ve en yüksek konsantrasyondaki (1000µg/mL) propilparaben uygulama grubunda 3'lü MN görüldüğü, diğer uygulama gruplarında ise sadece tekli MN'ların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. Farklı konsantrasyonlarda propilparaben uygulaması sonucu insan periferal lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (µg/mL)	İncelenen Binükleuslu Hücre Sayısı	Binükleuslu Hücreler İçindeki MN Frekansları			Ortalama MN Sayısı ±S.H. (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ±S.H.
			(1)	(2)	(3)		
Distile su	-	4000	9	1	-	0,275±0,62	1,53±0,12
EMS	0,7	4000	71	10	4	2,575±1,31*	1,48±0,18
Propilparaben	125	4000	15	-	-	0,375±1,19	1,50±0,25
	250	4000	20	-	-	0,500±0,40	1,44±0,29
	500	4000	19	-	-	0,475±0,62	1,25±0,21*
	1000	4000	16	1	1	0,525±1,19	1,20±0,21*

MN:Mikronükleus; S.H.:Standart hata; *:Gruplar arasındaki fark p<0,01 düzeyinde önemlidir.

Çizelge 4.12 incelendiği zaman, propilparabenin tüm konsantrasyonlarda MN miktarını artırdığı gözükmemektedir. Ancak bu artışın tüm propilparaben uygulama grupları için negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemsiz (p>0,01) olduğu, sadece EMS uygulama grubunun anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir (p<0,01).

Ayrıca, 1, 2, 3 ve 4 nükleuslu hücrelerin sayılmasıyla hesaplanan nükleer bölünme indeksinin (NBİ) propilparabenin tüm konsantrasyonlarında negatif kontrol grubuna göre düştüğü ve stotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.12). NBİ oranları propilparaben uygulama gruplarında sırasıyla $1,50 \pm 0,25$; $1,44 \pm 0,29$; $1,25 \pm 0,21$ ve $1,20 \pm 0,21$ iken, EMS pozitif kontrol grubunda bu oran $1,48 \pm 0,18$, negatif kontrol grubunda ise $1,53 \pm 0,12$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.12). NBİ oranları istatistiksel olarak negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece son iki konsantrasyonda (500 ve $1000 \mu\text{g/mL}$) anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir ($p > 0,01$). EMS grubu da dahil diğer tüm uygulama gruplarından elde edilen veriler istatistiksel olarak önemsiz sonuç vermiştir ($p < 0,01$).

4.4.3. Bütilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular

Farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve $1000 \mu\text{g/mL}$) bütilparaben uygulaması sonucunda elde edilen ortalama MN miktarları sırasıyla $0,250 \pm 0,64$; $0,300 \pm 0,40$; $0,300 \pm 0,70$ ve $0,425 \pm 0,47$ iken, bu oranlar pozitif kontrol grubunda $2,575 \pm 1,31$, negatif kontrol grubunda ise $0,275 \pm 0,62$ olarak tespit edilmiştir. İncelenen binükleuslu hücreler içerisindeki MN frekanslarına bakıldığında sadece EMS pozitif kontrol grubunda 3'lü MN görüldüğü diğer tüm uygulama gruplarında ise tekli MN'ların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Tekli MN'ların sayıları kontrol grubunda 9, uygulama gruplarında ise 10-17 arasında değişmiş ve artış göstermiştir.

Çizelge 4.13 incelendiğinde, bütilparabenin en düşük konsantrasyonlu ($125 \mu\text{g/mL}$) uygulama grubu hariç tüm konsantrasyonlarda MN frekansını arttırdığı belirlenmiştir ve sırasıyla $0,300 \pm 0,40$; $0,300 \pm 0,70$ ve $0,425 \pm 0,47$ bulunmuştur. Ancak uygulama gruplarına ait sonuçlar EMS pozitif kontrol grubu ve negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sadece EMS uygulama grubunun anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir ($p < 0,01$).

Çizelge 4.13. Farklı konsantrasyonlarda bütılparaben uygulaması sonucu insan periferall lenfosit hücrelerinde oluşın MN ve NBİ değlereri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon (µg/mL)	İncelenen Binükleuslu Hücre Sayısı	Binükleuslu Hücreler İçindeki MN Frekansları			Ortalama MN Sayısı ±S.H. (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) ±S.H.
			(1)	(2)	(3)		
Distile su	-	4000	9	1	-	0,275±0,62	1,53±0,12
EMS	0,7	4000	71	10	4	2,575±1,31*	1,48±0,18
Bütılparaben	125	4000	10	-	-	0,250±0,64	1,55±0,21
	250	4000	12	-	-	0,300±0,40	1,46±0,25
	500	4000	12	-	-	0,300±0,70	1,46±0,16
	1000	4000	17	-	-	0,425±0,47	1,28±0,34*

MN:Mikronükleus; S.H.:Standart hata; *:Gruplar arasındaki fark p<0,01 düzeyinde önemlidir.

Bütılparabenin NBİ üzerine etkisi incelendiğinde 125µg/mL’lik uygulama grubu hariç diğer tüm gruplarda (250, 500 ve 1000µg/mL) negatif kontrol grubuna göre düşüşün olduğu ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.13). NBİ oranları, bütılparaben uygulama gruplarında sırasıyla 1,55±0,21; 1,46±0,25; 1,46±0,16 ve 1,28±0,34 iken, pozitif kontrol grubunda bu oran 1,48±0,18, negatif kontrol grubunda ise 1,53±0,12 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Tüm uygulama gruplarına ait NBİ değlereri, negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece bütılparabenin en yüksek konsantrasyonunda (1000µg/mL) sonuç istatistiksel olarak anlamlı (p<0,01), diğer tüm uygulama gruplarında ise anlamsız (p>0,01) bulunmuştur.

4.4.4. Etilparaben uygulaması sonucu MN testi ile elde edilen bulgular

Çalışmalarımızda kullandığımız parabenlerden sonuncusu etilparabendir. Donörlerden alınarak hazırlanan kan kültürlerine farklı konsantrasyonlarda (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) etilparaben uygulanması sonucunda elde edilen ortalama MN değlereri sırasıyla 0,175±0,25; 0,225±0,47; 0,225±0,75 ve 0,350±0,28 iken bu oranlar pozitif

kontrol grubunda $2,575 \pm 1,31$, negatif kontrol grubunda ise $0,275 \pm 0,62$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.14). İncelenen binükleuslu hücreler içerisindeki MN frekanslarına bakıldığında sadece EMS pozitif kontrol grubunda 3'lü MN görüldüğü diğer tüm uygulama gruplarında ise tekli MN'ların olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.14).

Etilparaben uygulama gruplarından elde edilen veriler pozitif ve negatif kontrol gruplarından elde edilen verilerle istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, diğer paraben gruplarında olduğu gibi sadece EMS uygulama grubunun anlamlı sonuç verdiği gözlenmiştir ($p < 0,01$) (Çizelge 4.14).

Ayrıca Çizelge 4.14 incelendiğinde, uygulama gruplarına ait NBİ oranları negatif kontrole yakın bulunmuştur. NBİ oranları, etilparaben uygulama gruplarında sırasıyla $1,60 \pm 0,21$; $1,58 \pm 0,33$; $1,59 \pm 0,14$ ve $1,54 \pm 0,25$ iken pozitif kontrol grubunda bu oran $1,48 \pm 0,18$, negatif kontrol grubunda ise $1,53 \pm 0,12$ olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. Farklı konsantrasyonlarda etilparaben uygulaması sonucu insan periferik lenfosit hücrelerinde oluşan MN ve NBİ değerleri

Uygulama Grupları	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	İncelenen Binükleuslu Hücre Sayısı	Binükleuslu Hücreler İçindeki MN Frekansları			Ortalama MN Sayısı $\pm$ S.H. (%)	Nükleer Bölünme İndeksi (NBİ) $\pm$ S.H.
			(1)	(2)	(3)		
Distile su	-	4000	9	1	-	$0,275 \pm 0,62$	$1,53 \pm 0,12$
EMS	0,7	4000	71	10	4	$2,575 \pm 1,31^*$	$1,48 \pm 0,18$
Etilparaben	125	4000	7	-	-	$0,175 \pm 0,25$	$1,60 \pm 0,21$
	250	4000	9	-	-	$0,225 \pm 0,47$	$1,58 \pm 0,33$
	500	4000	9	-	-	$0,225 \pm 0,75$	$1,59 \pm 0,14$
	1000	4000	14	-	-	$0,350 \pm 0,28$	$1,54 \pm 0,25$

MN: Mikronükleus; S.H.: Standart hata; *: Gruplar arasındaki fark $p < 0,01$ düzeyinde önemlidir.

İnsan periferik lenfositlerinde *in vitro* olarak yaptığımız çalışmalar sonucunda, hiçbir paraben grubunun genotoksik etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Hem KKD hem de MN testleri sonucunda elde ettiğimiz verilere göre; parabenlerden özellikle propilparabenin KKD ve MN frekanslarını arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamsız olduğu belirlenmiştir ($p>0,01$). Bununla birlikte parabenlerin olası sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla araştırdığımız replikasyon indeksi (Rİ) ve nükleer bölünme indeksi (NBİ) değerlerini incelediğimizde özellikle propilparaben ve bütillparabenin yüksek konsantrasyonlarda bu değerleri düşürdüğü ve sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.12 ve 4.13).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gıda sanayinde kullanılan birçok gıda katkı maddesinin toksik etkili olup olmadığı bilim dünyasında halen tartışılmaktadır. Gıdalara uygulanan maddelerin miktarı ve buna maruz kalan insanların sayısı göz önüne alındığında bu konunun önemi açıkça anlaşılmaktadır. Bu nedenle bilim adamları yıllardır birçok gıda katkı maddesinin olası klastojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerini *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle belirlemeye çalışmaktadırlar.

Son yıllarda çeşitli kimyasal maddelerin insan genomunda mutasyonlara sebep olup olmadıklarının ortaya çıkarılmasında, *in vitro* ortamda insan lenfosit kültürüyle yapılan kısa süreli genotoksisite testlerinden kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) testleri ile *in vivo* ortamda *Drosophila melanogaster* ile yapılan somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda da, gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan parabenlerin olası genotoksik, mutajenik ve sitotoksik etkileri bu test yöntemleri kullanarak araştırılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız parabenler (metilparaben, propilparaben, bütılparaben ve etilparaben), gıdalarda koruyucu olarak kullanılan antimikrobiyal katkı maddeleridir. Literatürde antimikrobiyal özellikte koruyucu gıda katkı maddeleriyle ilgili yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Ancak bizim çalışmamızda kullandığımız parabenler, daha önce *D. melanogaster*'de ya da insan kanı lenfosit hücrelerinde hiç çalışılmamıştır.

Deneylerimizden elde ettiğimiz verilere göre, parabenlerin *D. melanogaster* larvalarında yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği ve hayatta kalış oranlarını düşürdüğü (Çizelge 4.1) ancak genotoksik etki göstermedikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.2-Çizelge 4.6). Araştırmamızda, trans-heterozigot larvalarla yapılan mortalite testlerinde, distile su kullanılarak hazırlanan negatif kontrol grubunda hayatta kalan larva sayısı %98 iken 1mM EMS kullanılarak hazırlanan pozitif kontrol gruplarında bu oran %85'dir. Negatif ve pozitif kontrol grupları arasındaki fark istatistiki olarak $p < 0,05$

düzeyinde önemli bulunmuştur. Parabenler için hayatta kalış oranları tüm uygulama gruplarında 100mM, 150mM, 200mM ve 250mM konsantrasyon için sırasıyla etilparaben’de %98; %92; %85 ve %80, bütilparaben’de %95; %91; %87 ve %74, metilparaben’de %95; %90; %78 ve %70 ve propilparaben’de %90; %84; %79 ve %63 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1). Parabenler için en toksik etki, %63 hayatta kalış oranıyla 250mM propilparaben uygulama grubunda gözlenmiştir ($p<0,05$).

Elde edilen bu sonuçlara göre, kullanılan tüm parabenler konsantrasyon artışına paralel olarak *D.melanogaster*’in 3. evre larvalarında yaşama yüzdesini önemli ölçüde düşürmüştür. Bu etkinin genotoksik olarak değil, farklı toksik etkiler meydana getiren mekanizmalar sonucunda olduğunu düşünmekteyiz (Çizelge 4.1). Yapılan bir araştırmada, parabenlerin toksik etki mekanizmasının, oksidatif fosforilizasyon sonucu meydana gelen mitokondriyal depolarizasyon ve ATP enerjisinin hızla tükenmesiyle membran geçirgenliğindeki değişikliklerin ortaya çıkardığı etkiler olduğu açıklanmıştır (Soni *et al.* 2001). Bununla birlikte, beş farklı koruyucu katkı maddesi (propilparaben, metilparaben, fenoksietanol, benzil alkol ve etilheksil gliserin)’nin apoptotik, nekrotik ve genotoksik etkilerinin insan deri fibroblast hücrelerinde *in vitro* olarak araştırıldığı çalışma sonucunda, bu maddelerin hücreleri apoptoza ve nekroza sokarak benzer sitotoksik etkiler gösterdikleri bildirilmiştir (de Carvalho *et al.* 2012).

Yapılan başka bir araştırmada, yine gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan benzoik asitin, *D. melanogaster* larvalarında olası toksik etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, 72 ± 4 saatlik trans-heterozigot larvalara 50mM, 75mM ve 100mM konsantrasyonlarda uygulanan benzoik asitin konsantrasyon artışına bağlı olarak larvalarda yaşama yüzdesini azalttığı tespit edilmiştir. Kontrol grubunda %98 olan yaşama yüzdesinin, benzoik asit uygulama gruplarında konsantrasyon artışına paralel olarak sırasıyla %72, %60 ve %40’lara kadar düştüğü belirlenmiştir (Sarıkaya ve Solak 2003). Bu sonuçlar, bizim deneylerimizden elde ettiğimiz sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

Günlük olarak çeşitli gıda maddeleri ile birlikte alınan parabenlerin güvenilirliklerinin değerlendirilmesi amacıyla, değişik zamanlarda Avrupa Birliği'nin yetkili kurumları tarafından risk değerlendirmeleri yapılmaktadır. Avrupa Komisyonu Gıda Maddeleri Bilimsel Komitesi'nin (The Scientific Committee on Food=SCF) 1994 yılında yapmış olduğu risk değerlendirmesinde, *in vitro* ve *in vivo* mutajenite testleri ile etil, metil, propil ve bütülpabenin genotoksik etki göstermediği bildirilmiştir. Ancak kesin olarak ispatlanmamış olmasına rağmen, özellikle bütülpaben ve propilparabenin fetüs üzerinde bazı anomalilere yol açtıkları ve bu nedenle teratojenite çalışmalarının yenilenmesine ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.

Metilparabenin *D. melanogaster*'de gelişim ve yumurta verimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, %2'lik metilparaben konsantrasyonunun toksik etki gösterdiği, yumurta, larva, pupa ve erginleşebilen birey sayılarını önemli oranda düşürdüğü belirlenirken, aynı çalışmada metilparabenin %0,02'lik düşük konsantrasyonunda bu sonuçların tersine östrojenik aktivite göstererek yumurta verimini arttırdığı vurgulanmıştır (Wei 2009). Çalışmamızda özellikle yüksek konsantrasyonlarda paraben uygulaması sonucunda benzer sonuçlarla karşılaşmıştır. Kontrol grubuna göre, tüm paraben uygulama gruplarında *D.melanogaster*'in yumurtadan ergine gelişim süresi uzamış, larvalardan erginleşebilen birey sayısında düşüşler olmuş ve erginleşebilen bireyler arasında birçok malformasyonlu bireylere rastlanılmıştır (Şekil 4.1-4.3). Ayrıca, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, erginleşebilen bireylerin vücut büyüklüklerinin kontrol grubu bireylerine göre oldukça küçük olduğu da gözlenmiştir (Şekil 4.4).

Terasaki *et al.* (2009) paraben ve klorlu paraben türevlerinin sucul organizmalardaki akut toksik etkilerini belirlemek için, *Daphnia magna*'da immobilizasyon testi ve *Vibrio fischeri*'de biyoluminesans inhibisyonu testleri ile farklı parabenlerin düşük etkili olsa da toksik olabilecekleri sonucuna varmışlardır. Yapılan çalışmalarla, parabenlerin hücresel düzeyde, lizozomal enzimlerin salgılanmasını inhibe ederek hücre fonksiyon bozukluklarına (Bairati *et al.* 1994) ve mitokondriyal disfonksiyona (Nakagawa and Moore 1999) neden olabilecekleri gösterilmiştir. Çalışmamızın sonucunda

D.melanogaster'in yaşama yüzdesinde konsantrasyon artışına bağlı olarak meydana gelen azalmanın bu tür etkiler sonucu olabileceğini düşünmekteyiz.

Avrupa Gıda Güvenliği Resmi Otoritesi'nin (The European Food Safety Authority=EFSA) 2004 yılında yapmış olduğu risk değerlendirmesinde, metilparabenle yapılan yeni çalışmalarda tavşanda günlük 300mg/kg vücut ağırlığı dozunun ve kemiricilerde 550mg/kg vücut ağırlığı dozunun fetüs üzerinde herhangi bir toksisiteye yol açmadığı bildirilmiştir. Avrupa Komisyonu Tüketici Ürünleri Bilimsel Komitesi'nin (Ec Scientific Committee On Consumer Products=SCCP) 2005 yılı risk değerlendirmesinde ise sıçanlar, köpekler ve fareler üzerinde yapılmış akut, subakut ve kronik toksisite çalışmalarına göre parabenlerin toksik, karsinogenik, genotoksik ve teratojenik olmadığı bildirilmiş ve tüm parabenler için günlük alım miktarı (ADI= Acceptable daily intake) değerinin 10mg/kg olduğu kabul edilmiştir. Bu değerlendirmeye göre, parabenlerin ester bağlarının kırılarak yoğun bir biçimde metabolize oldukları ve dokularda birikmedikleri bildirilmiştir (SCCP 2005). Fisher *et al.* (1999) tarafından yapılan araştırmalar sonucunda parabenlerin NOAEL değeri (No observable adverse effect level = Hiçbir yan etkinin gözlenemediği en yüksek doz) 2mg/kg/gün olarak tespit edilmiş ve bu değer, Tüketici Güvenliği Bilimsel Komitesi (Scientific Committee on Consumer Safety=SCCS) tarafından da kabul edilmiştir. Bu tarihten sonra konu ile ilgili pek çok araştırma yapılmış ve bazı paraben türlerinin toksik olabileceği yönünde de bulgular elde edilmiştir. Ancak aynı komitenin yayınladığı son bildiride de (SCCS 2010) parabenler için daha önce belirlenen NOAEL değerlerinin güvenilir olduğu, toksik etkilerin ancak NOAEL değerinin çok daha yüksek oranlarda kullanıldığı zaman meydana gelebileceği belirtilmiştir.

Literatürde gıda katkı maddelerinin zararlı olup olmadığına ilişkin pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların neticesinde, güvenilir olduğu düşünülen birçok maddenin aslında tehlikeli olduğu sonucuna varılmış ve çeşitli gıda kuruluşları ile bu sektörde çalışan ve bu maddelere doğrudan maruz kalanlar ile gıda maddelerini kullanarak dolaylı olarak alan kişiler bu konularda uyarılmıştır. Örneğin, 39 farklı gıda katkı maddesinin genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışma sonucunda; 7 gıda boyasının

(amarant, allura kırmızısı, kokkin, tartrazin, eritrosin, floksin ve rose bengal), 2 antioksidan maddenin (bütillenmiş hidroksianisol ve bütillenmiş hidroksitoluen), 3 fungusitin (bifenil, sodyum fenilfenol ve tiyabendazol) ve 4 gıda tatlandırıcısının (sodyum siklamat, sakkarin, sodyum sakkarin ve sukloroz) farelerin sindirim sistemi organlarında DNA hasarı meydana getirerek genotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir (Sasaki *et al.* 2002).

Çalışmamızın *in vivo* olarak yapılan ikinci kısmında, parabenlerin genotoksik etkileri *D.melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile araştırılmıştır. Bu deneylerden elde edilen verilere göre, dört farklı konsantrasyonda (100mM, 150mM, 200mM ve 250mM) uygulanan parabenlerin hiçbirisi genotoksik etkili bulunmamıştır (Çizelge 4.2-4.6).

Deneylerimizde kullandığımız parabenlerden, metilparaben uygulaması sonucunda oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon tiplerinin tümünde sayısal olarak artış gözleendiği, ancak bu artışların $p>0,05$ düzeyinde istatistiksel olarak önemsiz (i) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3). Çalışmamızda kullandığımız parabenlerden propilparaben uygulaması sonrasında, normal kanat fenotipinde oluşan küçük tek tip klon tipinde en düşük uygulama grubu (100mM) hariç tüm uygulama gruplarında sayısal olarak artış gözleendiği, ancak bu artışın kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($P>0,05$). Serrat kanat fenotipinde ise sadece 250mM'lık uygulama grubunda sayısal artış gözlenmiş ancak bu artış da istatistiksel olarak önemsiz (i) bulunmuştur (Çizelge 4.4). Bir diğer paraben grubu olan bütılparaben uygulaması sonrasında, normal kanat fenotipinde oluşan küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, toplam *mwh* ve toplam klon frekansları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yalnızca, kontrol grubu için 0,03 olan büyük tek tip klon frekansının 250mM uygulama grubunda 0,04 olduğu tespit edilmiştir. Diğer klon frekanslarında ise herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir (Çizelge 4.5). Deneylerimizde kullandığımız son paraben grubu olan etilparaben uygulaması sonrasında, normal kanat fenotipi için, kontrol ve uygulama grupları birbiriyle karşılaştırıldığı zaman, kullanılan konsantrasyonların hiçbirisinde incelenen klon

tiplerine ait herhangi bir artış olmamıştır. Yalnızca serrat kanat fenotipinde özellikle 200 ve 250mM’lık uygulama gruplarında küçük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon frekanslarında küçük bir artış gözlenmiştir. Ancak bu artış da istatistiksel olarak önemsiz (i) bulunmuştur (Çizelge 4.6).

Aubert *et al.* (2012)’un Sprague-Dawley sıçanları ile yaptıkları çalışma sonucunda metil, propil ve bütülpabenin memeli organizmalar üzerinde zararlı bir etki verecek oranda plazmada birikmediği, emilimlerinin çok iyi olduğu ve tamamen zararsız küçük metabolitlere parçalandıkları sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında, parabenlerin genotoksik etki göstermemesinin nedenlerinden birinin de yukarıdaki çalışmada belirtildiği gibi uyguladığımız parabenlerin *D. melanogaster*’in sindirim sistemi tarafından kolayca emilimlerinin gerçekleştirilip zararsız küçük metabolitlere parçalanmaları ve organizmada biriktirilmeden dışarı atılmaları olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde, koruyucu gıda katkı maddelerinin genotoksitesisi ile ilgili olarak kanat benek testi kullanılarak yapılan çok az çalışmaya rastlanmıştır. Bu çalışmalardan birisinde, sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitrat gibi koruyucu gıda katkı maddelerinin, 25, 50, 75 ve 100mM’lık konsantrasyonlarda genotoksik etkileri, *D. melanogaster*’de SMART ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, 50, 75 ve 100mM’lık konsantrasyonlarda tüm uygulama gruplarında küçük tek tip, büyük tek tip, toplam *mwh* ve toplam klon sayılarında artışların olduğu ve bu artışların da istatistiksel olarak pozitif (+) sonuç verdiği belirlenmiştir. En düşük uygulama grubu olan 25mM’lık konsantrasyonda ise elde edilen bulgular ya negatif (-) ya da önemsiz (i) olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, tüm bu maddelerin karışımlarından elde edilen uygulama grubunda, 25mM konsantrasyon da dahil tüm konsantrasyonlarda genotoksik etkinin gözlemlendiği tespit edilmiştir (Sarıkaya and Çakır 2005). Ayrıca, tüm bu maddelerle yapılan ömür uzunluğu deneylerinde, özellikle 75mM’lık konsantrasyonda, *D. melanogaster*’in ergin bireylerinde ortalama ömür uzunluğunun kontrol grubuna göre önemli oranda kısaldığı belirlenmiştir (Sarıkaya *et al.* 2006). Yine, gıda katkı maddesi olarak kullanılan çeşitli gıda boyalarının da

(tartrazin, amarant, sunset yellow, ponceu 4R, black pn, brilliant blue, pea gren ve quinolin yellow) ömür uzunluğunu hem dişi hem erkek popülasyonlarında önemli ölçüde kısalttığı tespit edilmiştir (Uysal ve Semerdöken 2011; Semerdöken 2012).

Schlatter *et al.* (1992)'un koruyucu katkı maddelerinden potasyum sorbat, sodyum sorbat ve 4,5-epoksi-2-heksenoik asitin olası genotoksik etkilerini SMART ile araştırdıkları çalışma sonucunda, sadece 4,5-epoksi-2-heksenoik asitin zayıf genotoksik etkiye sahip olduğu, potasyum sorbat ve sodyum sorbatın ise genotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. *D. melanogaster* ile yapılan bir diğer çalışma sonucunda, koruyucu katkı maddelerinden metil ürea genotoksik etki göstermezken sodyum nitritin 36mM konsantrasyonda zayıf genotoksik etki gösterdiği, metil ürea ve sodyum nitritin birlikte uygulanması sonucunda ise genotoksik etkinin önemli derecede arttığı belirlenmiştir (Guzman-Rincon *et al.* 1998). Bir diğer çalışmada, gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan benzoik asitin olası genotoksik etkisi yine *D. melanogaster*'de SMART ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, 72±4 saatlik trans-heterozigot larvalara 50mM, 75mM ve 100mM konsantrasyonlarda uygulanan benzoik asitin konsantrasyon artışına bağlı olarak kanatlarda gözlenen toplam mutasyon oranını kontrol grubuna göre artırdığı gözlenmiştir (Sarıkaya ve Solak 2003). Çalışmamızda kullandığımız parabenler (para-hidroksibenzoik asit), benzoik asitin türevlerinden birisi olmasına karşın, daha yüksek konsantrasyonlarda (100mM, 150mM, 200mM ve 250mM) bile genotoksik etki gözlenmemiştir. Ayrıca, yapılan literatür taramalarımızda, benzoik asitin genotoksik olmadığına dair birçok çalışma da bulunmaktadır (McCann *et al.* 1975; Ishidate *et al.* 1984; Nakamura *et al.* 1987; Zeiger *et al.* 1987). Bu literatür bilgileri bizim çalışmamız ile de paralellik göstermektedir.

Graf *et al.* (1989) aralarında sodyum nitrit gibi koruyucu gıda katkı maddelerinin de bulunduğu 30 adet kimyasal maddeyi *D. melanogaster*'de SMART ile genotoksik açıdan değerlendirmiştir. Kronik beslenme sonrasında sodyum nitrit, 72,5 mM'lık konsantrasyonda genotoksik etkili bulunmuştur.

Koruyucu özellikteki katkı maddelerinin dışında, yine gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılan gıda boyalarından tartrazinin genotoksik etkisi *Drosophila*'da SMART ile Niraj *et al.* (1989) tarafından araştırılmış ve tartrazinin hem mutajenik hem de rekombinojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışmada, 5 farklı gıda boyasının (amarant, patent blue, karminik asit, indigotin ve eritrosin) olası genotoksik etkileri yine *D. melanogaster*'de SMART ile araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, karminik asit ve indigotin negatif (-), eritrosinin ise önemsiz (i) genotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, 25mg/mL'lik konsantrasyonda patent blue, 12,5, 25 ve 50mg/mL'lik konsantrasyonlarda ise amarantın pozitif (+) genotoksisite gösterdiği tespit edilmiştir (Sarıkaya *et al.* 2012).

Çalışmamızın son bölümünde, *in vitro* şartlarda kültüre edilmiş insan periferik lenfosit hücrelerinde, kardeş kromatid değişimi (KKD) ve mikronükleus (MN) genotoksisite testleri ile yaptığımız deneyler negatif sonuç verse de, yüksek konsantrasyonlarda replikasyon indeksi (Çizelge 4.8) ve nükleer bölünme indeksi (Çizelge 4.12 ve 4.13) oranlarında anlamlı düşüşler belirlenmiştir. Örneğin distile su negatif kontrol grubunda $2,41 \pm 0,18$ olan replikasyon indeksi oranının propilparabenin en yüksek uygulama grubunda (1000µg/mL) $1,89 \pm 0,12$ 'ye kadar düştüğü tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Yine aynı madde, distile su negatif kontrol grubunda $1,53 \pm 0,12$ olan nükleer bölünme indeksini 500µg/mL uygulama grubunda $1,25 \pm 0,21$ 'e, 1000µg/mL uygulama grubunda ise $1,20 \pm 0,21$ 'e kadar düşürmüştür. Tüm bu verilerin $p > 0,01$ düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu ve özellikle propilparabenin yüksek konsantrasyonlarda genotoksik olmasa da sitotoksik etki gösterebileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Kısa süreli genotoksisite testleri olarak bilinen ve herhangi bir kimyasal maddenin genotoksik olup olmadığının belirlenmesinde kullanılan metodlardan birisi olan kardeş kromatid değişimi, kromozomlarda yapısal değişimle sonuçlanmayan, replike olan kromozomlarda, kromatidler arasında homolog bölgelerin karşılıklı değişimi olarak tanımlanmaktadır (Carrona and Natarajan 1988; Tucker *et al.* 1993). Yapılan birçok araştırma ile mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvan hücrelerinde, kardeş kromatid değişimi frekansının arttığı ve nokta

mutasyonlarının artışı ile de kardeş kromatid değişimi frekansı arasında doğru orantılı bir ilişkinin olduğu saptanmıştır (Perry and Evans 1975; Carrano *et al.* 1978; Albertini *et al.* 2000). Benzer bir ilişkinin, kardeş kromatid değişimi frekansının artışıyla *in vivo* tümörlerin oluşumu arasında da olduğu bildirilmiştir (Cheng *et al.* 1981). Ayrıca, yapılan pek çok araştırmayla, kardeş kromatid değişimi frekansında meydana gelen artışların, kalıcı DNA hasarının da birer göstergesi olduğu vurgulanmıştır (Palitti *et al.* 1982; Aksoy *et al.* 2006; Yüzbaşıoğlu *et al.* 2008).

Kısa süreli genotoksisite testlerinden bir diğeri olan mikronükleus testinde, kimyasal madde uygulaması sonucunda meydana gelen mikronükleusların, hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan ve esas çekirdeğe dahil olmayan, asentrik kromozom fragmentlerinden ve/veya iç ipliklerinden ayrılarak kutuplara göç edemeyen tam bir kromozomdan oluştukları belirlenmiştir (Fenech 2000). Fenech (2000)'e göre telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve/veya fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül etmekte ve böylece ana nükleustan daha küçük yapıda mikronükleuslar oluşmaktadır. Romagna (1993) yaptığı araştırma sonucunda, mikronükleusların varlığının *in vivo* ve *in vitro* genotoksik ajanların potansiyellerini açıklamada önemli rol oynadığını tespit etmiştir. Chauhan and Sundararaman (1990) mikronükleus taşıyan hücrelerin, sonraki mitotik bölünmelerde poliploid ve anöploid hücrelere ve bunun sonucunda da mutasyona neden olabileceklerini belirtmişlerdir. Mamur (2009)'a göre mikronükleuslu hücrelerin oranı, kullanılan kimyasal maddenin anöjenik (kromozomların anafazda kutuplara gidememesinden kaynaklanan, kromozom sayısında hata meydana getiren etki) ve/veya klastojenik (DNA/kromozom yapısında hasara yol açan etkiler) etkisini göstermektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, büyük mikronükleusun, bir kromozom kaybından kaynaklanan anöjenik etkiyi, küçük mikronükleusun ise genetik materyal kaybını gösterdiği tespit edilmiştir (Zengin *et al.* 2011).

Literatürde, farklı koruyucu gıda katkı maddelerinin olası genotoksik, toksik ve mutajenik etkilerinin araştırıldığı birçok araştırma mevcuttur. Bu maddelerden birisi olan bifenil ile yapılan bir çalışma sonucunda, maddenin artan konsantrasyona bağlı olarak kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus frekanslarını

negatif kontrol grubuna göre önemli oranda artırarak genotoksik, replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi oranlarını da önemli oranda düşürerek sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Parlak 2007). Bu çalışmada saptanan kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus sayısındaki artışın bifenilin klastojenik etkisinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Bazı araştırmacılar, klastojenik etkilerin ortaya çıkmasında hücrede bulunan topoizomera II (giraz) enziminin önemli rol oynadığını tespit etmişlerdir (Burden and Osherooff 1998; Müller and Kasper 2000; Lynch *et al.* 2003). Burden and Osherooff (1998) bazı kimyasal maddelerin memeli topoizomera II enziminin DNA kırılma ve yeniden birleşme siklusunu bozduğunu, bu maddelerin ya enzimin katalitik etkisini yok ettiklerini ya da DNA ile görevli enzimler arasındaki normal olan geçici ayrılmaları devamlı kılarak DNA'da çift iplik kırıklarına sebep olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca başka araştırmacılar da çeşitli gıda koruyucu maddeleriyle yapmış oldukları çalışmalarında, bu maddelerden bazılarının kromozom aberasyonlarını ve kardeş kromatid değişimini uyardığını, bazılarının da uyarmadığını saptamışlardır. Örneğin Basler *et al.* (1987) propiyonik asitin genotoksik aktivitesini araştırmak üzere, SOS kromotesti, *Salmonella*/mikrozom testi, *E.coli* tamir testi, *in vitro* kardeş kromatid değişimi testi ve *in vivo* mikronükleus testlerini uygulamışlardır. Yapılan tüm testler negatif sonuç vermiş ve bu sonuçlara göre araştırmacılar, propiyonik asitin mutajenik olmadığına karar vermişlerdir. Vernole *et al.* (1988) benzoik asitin potasyum tuz formlarının insan periferik lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyonu üzerine etkilerini araştırmışlar ve sonuçta benzoik asitin kardeş kromatid değişimi ve kromozom aberasyonu oranlarını artırmadığını bulmuşlardır.

Başka bir çalışmada, yine antimikrobiyal katkı maddelerinden olan sodyum propiyonat, potasyum propiyonat ve kalsiyum propiyonatın genotoksik etkileri, *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde incelenmiştir. Çalışılan katkı maddelerinin 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000µg/mL'lik konsantrasyonları 24, 48 ve 72 saat süre ile *Allium cepa* kök ucu hücrelerine uygulanmıştır. Sonuç olarak, tüm katkı maddelerinin *Allium cepa* kök ucu hücrelerinde; kromozom kırıklarına, C-mitoza, yapışıklığa, anafaz köprülerine ve mikronükleus oluşumuna sebep olduğu bulunmuştur. Ayrıca yine bu maddelerin,

konsantrasyon ve uygulama süresi artışına paralel olarak kromozomal anormallik frekansını artırdığı ve mitotik indeksi düşürdüğü belirlenmiştir (Türkoğlu 2008).

Yapılan bir çalışmada, koruyucu katkı maddesi olarak gıdalarda sıklıkla kullanılan sitrik asit, fosforik asit ve kalsiyum propiyonatin *in vitro* genotoksik etkileri, insan periferall lenfositlerinde kromozom aberasyonları, kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve komet testleri kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, kullanılan katkı maddelerinin tümünün kromozom aberasyonları, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekanslarını kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırdığı, komet testinde ise, primer DNA hasarının sitrik asitin en yüksek dozunda, diğer uygulamalarda ise hemen hemen tüm dozlarda kontrole göre anlamlı oranda artış gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca mitotik indeks, tüm uygulamalarda kontrole göre anlamlı düşüş gösterirken replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi, çalışmada kullanılan maddelerden herhangi bir şekilde etkilenmemiştir. Elde edilen bulgular, çalışmada kullanılan maddelerin *in vitro* kültüre alınmış ve izole edilmiş insan lenfositlerinde klastojenik, mutajenik ve sitotoksik etkili olduğunu ayrıca primer DNA hasarını indüklediğini göstermiştir (Yılmaz 2008). Aynı testler kullanılarak yapılan bir diğer çalışma sonucunda, gıdalarda antimikrobiyal katkı maddesi olarak kullanılan sodyum sorbat ve potasyum sorbatın kardeş kromatid değişimi frekansını artırdığı ancak mikronükleus frekansını sadece sodyum sorbatın etkilediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, her iki maddenin de replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi oranlarını etkilemedikleri, ancak komet testi ile primer DNA hasarını önemli oranda artırdıkları tespit edilmiştir (Mamur 2009).

Bir diğer çalışmada, gıdalarda yapay tatlandırıcı olarak kullanılan maltitolun insan periferall lenfositlerinde genotoksik etkileri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda maltitolun, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus sayısını istatistiksel olarak önemli derecede artırdığı, ancak kromozom aberasyonları, replikasyon indeksi ve mitotik indeksi etkilemediği tespit edilmiştir. Sonuç olarak maltitolun insan lenfositlerinde zayıf genotoksik risk taşıdığı, fakat sitotoksik etkiye sahip olmadığı belirtilmiştir (Canımoğlu 2005). Bununla birlikte, unda beyazlatma maddesi olarak

kullanılan benzol peroksitin olası genotoksik etkisinin insan periferik lenfositlerinde *in vitro* olarak araştırıldığı çalışma sonucunda, benzol peroksitin sadece yüksek konsantrasyonlarda (75 ve 100µg/mL) kardeş kromatid değişimi, mikronükleus ve kromozom aberasyonları değerlerini artırdığı, replikasyon indeksi ve mitotik indeksi de düşürdüğü belirlenmiştir (Yavuz 2005). Giri *et al.* (2002) kromozomal anormalliklerin kimyasal maddelerde bulunan alkilleyici özellikten kaynaklandığını, alkilleyici ajanların da DNA hasarına yol açtığını belirtmişlerdir. Kimyasal maddelerin mutajenik aktivitesinin onların molekül yapısındaki alkil ve fosforil gruplarını taşıyan elektrofilik kısmın DNA'daki nükleofilik kısma bağlanabilme kapasitesine bağlı olabileceği belirtilmiştir (Giri *et al.* 2002). Yapılan birçok araştırma sonucunda, kromozomal anormalliklerin oluşmasında hücre siklusunun G₂ fazının çok önemli olduğu bildirilmiştir. Aslında oluşabilecek DNA hasarının büyük bir kısmı, hücre siklusunun G₂ fazında tamir edilebilmektedir (Rani and Rao 1991; Burim *et al.* 2001; Çelik 2003). Ancak yapılan çalışmalar sonucunda, kromozomal anormalliklerin artması DNA tamirinin yapılmadığı, yanlış yapıldığı veya engellendiği şeklinde yorumlanmaktadır. DNA sentezi esnasında, çeşitli kimyasal maddelerin mutajenik etkilerine bağlı olarak oluşan zincir kırıkları veya G₂ fazının bloke olması kromozomal anormalliklerin oluşmasına neden olmaktadır.

Mpountoukas *et al.* (2008) antimikrobiyal katkı maddeleri olan potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitritin sitogenetik etkilerini, insan lenfositlerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar, potasyum sorbatın 4 ve 8mM'lık konsantrasyonlarda, sodyum benzoatın ise 8mM'lık konsantrasyonda kardeş kromatid değişimi frekansını kontrol grubuna göre önemli miktarda artırdığını, potasyum nitritin ise kullanılan konsantrasyonlarda herhangi bir genotoksik etki göstermediğini belirlemişlerdir.

Başka bir çalışmada, farklı konsantrasyondaki (50, 100, 200 ve 500µg/mL) benzoik asitin genotoksik ve sitotoksik etkileri, insan periferik lenfositlerinde araştırılmıştır. Araştırma sonucunda, benzoik asitin özellikle yüksek konsantrasyonlarda (200 ve 500µg/mL) kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekanslarını kontrol grubuna göre önemli oranda artırdığı, mitotik indeksi düşürdüğü

ancak replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Araştırmacılar, benzoik asitin insan lenfositlerinde zayıf genotoksik etki gösterip toksik etkinin ancak çok yüksek konsantrasyonlarda gözlenebileceğini vurgulamışlardır (Yılmaz *et al.* 2009). Bununla birlikte literatürde benzoik asitin genotoksik olmadığına dair birçok çalışma da mevcuttur (McCann *et al.* 1975; Ishidate *et al.* 1984; Nakamura *et al.* 1987; Zeiger *et al.* 1987). Bizim çalışmamızda kullandığımız parabenler (para-hidroksibenzoik asit) de benzoik asitin türevlerinden birisi olmasına karşın, tıp kısımlı SMART ile elde edilen sonuçlarda olduğu gibi, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus testleri ile de genotoksik etkili bulunmamıştır (Çizelge 4.7-4.10 ve Çizelge 4.11-4.14). Bununla birlikte, insan kanı periferik lenfosit hücreleri ile yaptığımız ön denemelerde yüksek konsantrasyonlarda paraben uygulaması sonucunda çeşitli sitotoksik etkiler gözlenmiştir. Özellikle 1000µg/mL uygulamanın daha üzerinde, örneğin 1250, 2000 ve 3000µg/mL gibi uygulama gruplarında yeterli hücre çoğalması sağlanamamış ve bu nedenle çalışmalarımızda daha düşük konsantrasyonlar (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) tercih edilmiştir (Bölüm 3.2.2.a). Yapılan araştırmalar sonucunda, kimyasal maddelerin hücre enerji üretim merkezlerinin fonksiyonlarını baskı altında tutarak ATP sentezinin azaltıldığı ve bunun sonucunda hücre bölünmesinin yavaşlayıp sitotoksik etkilerin ortaya çıktığı tespit edilmiştir (Epel 1963; Jain and Andsorbhoy 1988). Bazı araştırmacılar da kimyasal maddelerin *in vitro* sitotoksik etkilerinin DNA çift iplik kırıklarının oluşmasına bağlı olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir (Vock *et al.* 1998; Kirkland and Müller 2000).

Koçak (2005) sitrik asitin *in vivo* genotoksik etkisini *Tinca tinca* (Pisces: Cyprinidae) eritrositlerinde mikronükleus testi ile araştırmıştır. Araştırmacı, sitrik asitin 200, 300 ve 400µg/mL'lik dozlarını kullanmış ve uygulama gruplarının tamamında mikronükleus oluşumunun kontrole göre önemli oranda arttığını belirtmiştir. Buna karşın, bir başka koruyucu gıda katkı maddesi olan potasyum sorbat ile farelerde, sıçanlarda, *Salmonella*'da ve memelilerde yapılan mutajenite ve genotoksisite testleri negatif sonuç vermiştir (Munzner *et al.* 1990; Jung *et al.* 1992; Schiffman and Schlatter 1992; Sasaki *et al.* 2002). Ayrıca potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitratın insan

periferal lenfosit hücrelerinde hiçbir sitotoksik etki göstermediği sadece potasyum sorbat ve sodyum benzoatın yüksek konsantrasyonlarda zayıf sitostatik ve genotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (Mpountoukas *et al.* 2008). Bu sonuçlar, çalışmamızın ikinci bölümünde insan lenfosit hücreleri ile yaptığımız *in vitro* deneylerden elde ettiğimiz sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Şöyle ki, çalışmamızda kullandığımız parabenlerden sadece propilparaben ve bütilparaben en yüksek konsantrasyonda (1000µg/mL) hem replikasyon indeksi hem de nükleer bölünme indeksi değerlerini önemli oranda azaltmış, ancak metilparaben ve etilparaben uygulama gruplarında böyle bir etkiye rastlanılmamıştır (Çizelge 4.8, Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13). Wilson III and Thompson (2007) kardeş kromatid değişiminin oluşum mekanizmasında, DNA tek zincir kırıklarının etkin bir rol oynadığını ve özellikle DNA’da çapraz bağlanmalara yol açan kimyasal maddelerin, kardeş kromatid değişimi frekansını artırdığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, DNA tek zincir kırıklarının önlenmesinde görev alan XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukların da kardeş kromatid değişimine neden olabileceğini vurgulamışlardır. Bununla birlikte, mikrotübüllerin düzenlenmesinde görev alan büyük bir sitozolik fosfoprotein olan OP18/statmin aktivitesinin, bu tür koruyucu gıda katkı maddelerinin ya da bunların metabolitlerinin etkisiyle engellenmesi ile sitotoksik etkilerin ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Wang *et al.* 2005).

Erdoğan (2008) koruyucu gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum metabisülfid, potasyum metabisülfid, sodyum propionat, potasyum propionat ve kalsiyum propionatın *Allium cepa*’da mitoz bölünme, kromozomlar ve DNA miktarı üzerine olan etkilerini araştırmıştır. Araştırma sonucunda, kullanılan tüm maddelerin mitotik safhaların oranlarını değiştirdiğini ve bu değişimlerin kullanılan kimyasal maddenin dozlarına bağlı olarak S fazındaki DNA sentezinin inhibisyonundan ve/veya iğ ipliği formasyonunun bloke olmasından kaynaklanabileceği vurgulanmıştır. Bununla birlikte birçok araştırmacı, kimyasal maddelerin mitotik indeks veya rekombinasyon indeksi üzerine etkilerinin, mitoza giren hücrede G₂ aşamasının bloke edilmesinden (Van’t Hof 1968) veya ATP seviyesinin düşüşüne bağlı olarak enerji üretim merkezlerinin baskılanmasından (Epel 1963; Jain and Andsorbhoy 1988) ya da replikasyonda görevli

DNA polimeraz ve mitotik iğ ipliklerinin sentezinde etkili olan çeşitli enzim yapılarının bozulmasından kaynaklanmış olabileceğini belirtmişlerdir (Hidalgo *et al.* 1989; Yüzbaşıoğlu *et al.* 2006). Ayrıca, bölünen hücre sayısındaki azalmanın, uygulanan kimyasal maddelerin mitodepresif etkilerinden kaynaklandığı da düşünülmektedir. Schulze and Kirschner (1986)'a göre, mitodepresyon aynı zamanda DNA ve çekirdek proteinlerinin sentezini de engellemektedir. Yapılan birçok araştırma sonucunda uygulanan kimyasal maddelerin daha çok interfazın S ve G₂ alt fazlarında genotoksik etki gösterdikleri ve bu nedenle diğer fazlara geçebilen hücre sayısında azalmaların olduğu belirlenmiştir (Salehzadeh *et al.* 2003; Kwankua *et al.* 2010).

Türkoğlu (2008) yaptığı çalışma sonucunda, kimyasal madde maruziyetinden sonra mitotik aşamaların etkilendiğini, profaz indeksinde artış olurken metafaz ve anafaz-telofaz indekslerinde düşüşlerin olduğunu belirlemiştir. Benzer sonuçların elde edildiği diğer çalışmalar sonucunda gözlenen bu etkinin CHFR (profaz/metafaz arası kontrol noktası) noktasından kaynaklandığı belirlenmiştir (Liman *et al.* 2011). Scolnic and Halazonetis (2000) CHFR'yi, mitotik strese yanıt olarak, hücrelerin metafaz safhasına girmesini geciktiren bir denetim noktası olarak tanımlamışlardır.

Matthews *et al.* (1956)'nin fare, sıçan ve köpeklerle yaptıkları akut ve kronik toksisite çalışmaları sonucunda, parabenlerin çok düşük oranda toksisite gösterdikleri ancak gıdalarda koruyucu madde olarak güvenli bir şekilde kullanılabilecekleri belirtilmiştir. Anderson (2008) etilparaben ve metilparabenin Çin hamster yumurtalık hücrelerinde kromozomal aberasyonları artırmasına karşın genel olarak mutajen olmadıklarını ifade etmiştir. Aynı yazar, parabenlerin alerjik bünyeli kişiler dışında herhangi bir yan etkisinin olmadığını da vurgulamıştır.

Parabenler son 50 yıldır gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Geniş bir aktiviteye sahip olması, düşük maliyeti ve emniyetle uzun süredir kullanılıyor olması bu bileşenleri antimikrobiyal koruyucu katkı maddesi olarak oldukça popüler bir konuma getirmiştir. Günümüzde birçok maya, küf ve bakteri çeşidine karşı sıkça kullanılmalarına karşın parabenlerin bu organizmalar üzerindeki

etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, genel olarak mikroorganizmaların zar geçirgenliğini ya da mitokondriyal fonksiyonlarını bozarak etki gösterdikleri düşünülmektedir (Sox 1997). Bununla birlikte yapılan bir çalışmada, parabenlerin *E. coli*'de mekanosensitif kanallarla etkileşime girerek bakteriyel osmotik gradiyenti bozduğu (Nguyen *et al.* 2005), bir başka çalışmada da metabolizmada önemli görevi olan serin aminoasitinin hücre zarından alımını inhibe ederek etki gösterdikleri bildirilmiştir (Freese *et al.* 1973). Parabenlerin antimikrobiyal etkilerine rağmen insan meme kanser dokusunda tespit edilmesinden sonra, kanser ile olan ilişkisi yoğun bir araştırma konusu haline almıştır (Byford *et al.* 2002; Darbre and Harvey 2008; Martin *et al.* 2010). Bununla birlikte parabenlere hiçbir şekilde maruz kalmamış erişkin erkek ve kadınların idrarında paraben bulgularına rastlanması, bu maddelerin önceki temaslarla vücutta biriktiğini göstermektedir (Xiaoyun *et al.* 2006). Tüm bu sonuçlar parabenlerin, antimikrobiyal koruyucular olarak güvenle kullanımı konusunda bazı kaygıları gündeme getirmiştir.

Birçok araştırmacı, parabenlerin yan etkilerinin özellikle östrojenik aktivitelerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Östrojenler, uterus dokusunun büyümesini ve hücre proliferasyonunu sağlayan büyüme hormonunun üretimini (Leung *et al.* 2004) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) yolunun aktivasyonunu düzenlerler (Kahlert *et al.* 2000). Bu nedenle, uterus kütlesindeki artış östrojenik aktivitenin güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Parabenlerin östrojenik aktiviteleri de özellikle uterotropik testler vasıtasıyla *in vivo* olarak birçok çalışmayla gösterilmiştir (Lemini *et al.* 1997; Routledge *et al.* 1998; Kawaguchi *et al.* 2009). Ovaryumları alınmış ve erginleşmemiş fare ve sıçanlara subkutan bütülpapaben uygulaması ile uterus kütlesinde artışın meydana geldiği bildirilmiştir (Lemini *et al.* 2004). Yapılan bir diğer çalışmada isobütülpapaben ve benzilparabenin de olgunlaşmamış farelerde uterus kütlesini artırdığı tespit edilmiştir (Darbre *et al.* 2002, 2003). Ayrıca balıklarda yapılan çalışmayla parabenlerin östrejenik aktivitenin bir başka göstergesi olan plasma vitellojen miktarında da artışa neden olduğu bulunmuştur (Pedersen *et al.* 2000). Bununla birlikte, son yıllarda CF-1 ve CD-1 fareleri ile yapılan uterotropik deneyler sonucunda bütülpapabenin uterusun ne ıslak ne de kuru ağırlığı üzerine herhangi bir etkisinin

olmadığı belirlenmiştir (Shaw and de Catanzaro 2009). Yapılan diğer araştırmalarla, tüm paraben türlerinin belli bir östrojenik aktiviteye sahip oldukları, ancak bu aktivitenin doğal bir östrojen olan ve bu tür çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan 17 β -estradiolün aktivitesinden 1 000 ila 1 000 000 katı kadar daha düşük olduğu bildirilmiştir (Van Meeuwen *et al.* 2008; Vo and Jeung 2009; Vo *et al.* 2010). Bununla birlikte yapılan pek çok araştırma ile parabenlerin östrojenik aktivitesinin, insan sağlığı açısından tehdit edici derecede önemli olmadığı sonucuna da varılmıştır (Witorsch and Thomas 2010; Scialli 2011).

Propilparaben ve bütılparaben ile yapılan diğer çalışmalar ile bu parabenlerin, genç erkek sıçanlarda düşük ortalama epididim ve seminal vezikül ağırlıkları, düşük sperm üretimi, düşük testosteron düzeyleri gibi olumsuz üreme etkilerine neden olabileceği belirtilmiştir (Oishi 2001, 2002). Ancak ilerleyen yıllarda başka deney hayvanlarıyla yapılan çalışmalarla parabenlerin üreme organları üzerine olumsuz etkilerinin olmadığı da tespit edilmiştir (Hoberman *et al.* 2008; Shaw and de Catanzaro 2009).

Parabenler için aslında en ilginç araştırma sonuçları, çeşitli bitkilerden ve hayvansal organizmalardan elde edilmiştir. Şöyle ki; yapılan bir çalışmada, havuç köklerinde 800 μ g/gr kadar parabenin doğal olarak bulunduğu ve bitki tarafından doğal yollarla sentezlendiği tespit edilmiştir (Sircar *et al.* 2007). Başka bitki türleri üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda da arpa, çilek, siyah üzüm, şeftali, havuç, soğan ve mango gibi bitkilerde p-hidroksibenzoik asit (paraben) ve türevlerinin bulunduğu belirlenmiştir (Bach *et al.* 1993; Viitanen *et al.* 2004). Parabenlerin bitkilerde bakteriyel veya mantar enfeksiyonlarına karşı ortak bir savunma ürünü olduğu, ayrıca bakterilerde, böceklerde, arı sütünde ve dişi köpeklerin vajinal salgılarında da bulunduğu yapılan araştırmalarla açığa çıkarılmıştır (Ishiwata *et al.* 1995; Peng *et al.* 2006; Godfrey 2010; Dweck 2011). Buradan da anlaşılacağı üzere, milyarlarca insan bu bitki ve meyveleri yemek suretiyle parabenlere doğal olarak her gün maruz kalmaktadır.

Bu çalışmayla gıda, ilaç ve kozmetik sanayinde sıkça kullanılan koruyucu katkı maddelerinden parabenlerin belirtilen dozlarda kullanıldığında, genotoksik etki

göstermediği ancak yüksek konsantrasyonlarda toksik etki gösterebileceği belirlenmiştir. Parabenlerin tüketilen gıdalarla birlikte, her gün farklı yollarla vücut içerisine girdiği düşünüldüğünde bu maddelere ve tüm katkı maddelerine karşı dikkatli olunması ve en azından tükettiğimiz ürünlerin içeriklerini bilerek hareket etmemiz gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Adams, E.J. and Mahan, L.K., 1984. Nutritional Care in Food Allergy and Food Intolerance. Food, Nutrition and Diet Therapy, 7th ed., Eds: Krause, M.V., Mahan, L.K. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 633-653.
- Aktaç, T., Kaboğlu, A., Ertan, F., Ekinçi, F. and Hüseyinova, G., 2003. The effects on citric acid (antioksidant) and benzoic acid (antimicrobial agent) on the Mouse liver: Biochemical and histopathological study. *Biologia*, 58, 343-347.
- Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D. and Ünal, F., 2006. Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers. *Journal of Applied Toxicology*, 26 (1), 10-15.
- Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E., Tice, R., Waters, M.D. and Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *International Programme on Chemical Safety*, 463 (2), 111-172.
- Aledo, R., Dutrillaux, B., Lombard, M. and Aurias, A., 1989. Cytogenetic study on eleven cutaneous neoplasms and two pre-tumoral lesions from xeroderma pigmentosum patients. *International Journal of Cancer*, 44, 79-83.
- Altuğ, T., 1999. Gıda katkı maddeleri, genel başlıklar. *Hekim ve Yaşam*, 29-31.
- Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü. and Demirağ, K., 2000. Gıda katkı maddeleri analiz yöntemleri. *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, 22, 1-244.
- Altuğ, T. ve Elmacı Y., 2001. Gıda Katkı Maddeleri. *Tatlandırıcılar*, Meta Basım, 286 s, İzmir, Türkiye.
- Ames, B.N., Mc Cann, J. and Yamasaki, E., 1975. Models for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, 31, 347-364.
- Anderson, D., Dewdney R. S., Jenkinson P.C., Lovell D.P., Butherworth R. and Connign D.M., 1986. Sister chromatid exchange (SCE) analysis in 106 control individuals. *Progress in Clinical & Biological Research*, 207, 39-58.
- Andersen, F.A., 2008. Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *International Journal of Toxicology*, 27, 1-82.
- Anonymous 2012a, [http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life cycle.jpg](http://flymove.unimuenster.de/Genetics/Flies/LifeCycle/LifeCyclePict/life%20cycle.jpg) (10.10.2012).
- Anonymous 2012b, http://students.iitk.ac.in/projects/_detail/fig2_34.jpg?id=timeline (10.10.2012)
- Anwar, W.A., Salama, S.I., Serafy, M.M., Hemida, S.A. and Hafez, A.S., 1994. Chromosomal aberrations and micronucleus frequency in nurses occupationally exposed to cytotoxic drugs. *Mutagenesis*, 4, 315-317.
- Arslan, M., 2004. Borik asitin insan periferik lenfositlerinde *in vitro* kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.

- Aşkın, H., Uysal, H. and Altun, D., 2007. Preventive role of folic acid on the developmental toxicity of phenol in *Drosophila melanogaster*. *Toxicology and Industrial Health*, 23, 591-598.
- Aubert, N., Ameller, T. and Legrand, J.J., 2012. Systemic exposure to parabens: pharmacokinetics, tissue distribution, excretion balance and plasma metabolites of [14C]-methyl-, propyl- and butylparaben in rats after oral, topical or subcutaneous administration. *Food and Chemical Toxicology*, 50 (3-4), 445-454.
- Ayar, A., Uysal, H. and Altun, D., 2009. The effects of cold shock on the longevity in Oregon R wild *Vestigial* mutant of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Ekoloji*, 19 (74), 38-44.
- Ayar, A., Uysal, H., Altun, D. and Aşkın, H., 2012. The effects of heat shock on the longevity in some strains of *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of Applied Biological Sciences*, 6 (1), 51-55.
- Bach, M., Schnitzler, J.P. and Seitz, H.U., 1993. Elicitor-induced changes in Ca^{2+} influx, K^{+} efflux, and 4-hydroxybenzoic acid synthesis in protoplasts of *Daucus carota* L. *Plant Physiology*, 103, 407-412.
- Barale, R., Chelotti, L., Davini, T., Del Ry, S., Andreassi, M. G., Ballardin, M., Bulleri, M., He, J., Baldacci, S., Di Pede, F., Gemignani, F. and Landi, S., 1998. Sister chromatid exchange and micronucleus frequency in human lymphocytes of 1,650 subjects in an Italian population: II. Contribution of sex, age, and lifestyle. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31 (3), 228-242.
- Bairati, C., Goi, G., Lombardo, A. and Tettamanti, G., 1994. The esters of p-hydroxybenzoate (parabens) inhibit the release of lysosomal enzymes by mitogen-stimulated peripheral human lymphocytes in culture. *Clinica Chimica Acta*, 224, 147-157.
- Basler, A., Von der Hude, W. and Scheutwinkel, M., 1987. Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 25, 287-290.
- Başaran, N., 2003. *Tıbbi Genetik Ders Kitabı*, Nobel&Güneş Tıp Kitap Evi, 465 s, Bursa.
- Bayel, İ., 2006. Terbinafin'in insan lenfosit kültürlerindeki etkilerinin kardeş kromatid değişimi (SCE) yöntemi ile *in vitro* araştırılması. Y. Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Baysal, V., Şahin, F., Erel, A., Oruk, S. and Menevşe, S., 2003. The effect of PUVA treatment on sister chromatid exchange (SCE) values in psoriasis vulgaris patients. *The Journal of Dermatological Treatment*, 14, 22-25.
- Benford, D., 2000. The Acceptable Daily Intake. A Tool For Ensuring Food Safety. ILSI Europe Concise Monographs Series. ILSI Press., 38 p, Belgium.
- Blaszczyk, A. and Skolimowski, J., 2007. Evaluation of the genotoxic and antioxidant effects of two novel feed additives (ethoxyquin complexes with flavonoids) by comet assay and micronucleus test. *Food Additives and Contaminants*, 24 (06), 553-560.
- Borroto, G.J.I., Creus, A., Marcos, R., Molla, R. and Zapatero, J., 2003. The mutagenic potential of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in the mouse bone marrow micronucleus test. *Toxicological Science*, 72 (2), 359-362.

- Bruel, S. and Coote, P., 1999. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1-17.
- Budayova, E., 1985. Effects of sodium nitrite and potassium sorbate on *in vitro* cultured mammalian cells. *Neoplasma*, 32 (3), 341-350.
- Bukowska, B., 2004. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology*, 135 (4), 435-441.
- Burden, D.A. and Osheroff, N., 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1400 (1-3), 139-154.
- Burim, R.V., Canalle, R., Lopes, J.L.C., Vichnewski, W. and Takahashi, C.S., 2001. Genotoxic accition of the sesquiterpene, lactone centratherin on mammalian cells in vitro and in vivo. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 21, 383-393.
- Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G.B., Pope, G.S., Sauer, M.J. and Darbre, P.D., 2002. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80, 49-60.
- Canımoğlu, S., 2005. Gıda tatlandırıcısı olarak kullanılan maltitolun insan lenfositlerinde sitogenetik etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindi, P.A. and Minkler, J.L., 1978. Sister chromatid exchanges as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271, 551-553.
- Carrano A.V. and Natarajan A.T., 1988. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Research*, 204, 379-406.
- Cavallo, D., Ursini, C.L., Perniconi, B., Francesco, A., Giglio, M., Rubino, F.M., Marinaccio, A. and Iavicoli, S., 2005. Evaluation of genotoxic effects induced by exposure to antineoplastic drugs in lymphocytes and exfoliated buccal cells of oncology nurses and pharmacy employees. *Mutation Research*, 587, 45-51.
- Chauhan L.K.S. and Sundararaman V., 1990. The effect of substituted ureas on plant cells I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Cytologia*, 55, 91-98.
- Cheng, M., Conner, M.K. and Alarie, Y., 1981. Potency of some carbamates as multiple tissue sister chromatid exchange inducers and comparison with known carcinogenic activities. *Cancer Research*, 41, 4489-4492.
- Choy, W.N., 2001. Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, INC., 390 p, New York.
- Chu, K., Snyder, R. and Econs, M.J., 2006. Disease status in autosomal dominant osteopetrosis type 2 is determined by osteoclastic properties. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21 (7), 1089-1097.
- Cicchetti, R., Bari, M. and Argentin, G., 1999. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with crest staining: an *in vivo* study in mice. *Mutation Research*, 439, 239-248.
- Clark, A.M. and Rockstein, M., 1964. Aging in insects. *Physiology of Insecta*, 1, 227-281.

- Countryman, R.I. and Heddle J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 321-332.
- Çavaş, T., 2004. Endüstriyel atıkların genotoksik etkilerinin mikronukleus testi ve agnor analiz teknikleri kullanılarak in-situ ve laboratuvar koşulları altında araştırılması. Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Çelik, M., 2003. Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferik lenfositlerinde sitogenetik etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Darbre, P.D., Byford, J.R., Shaw, L.E., Horton, R.A., Pope, G.S. and Sauer, M.J., 2002. Oestrogenic activity of isobutylparaben *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Applied Toxicology*, 22, 219-226.
- Darbre, P.D., Byford, J.R., Shaw, L.E., Hall, S., Coldham, N.G., Pope, G.S. and Sauer, M.J., 2003. Oestrogenic activity of benzylparaben. *Journal of Applied Toxicology*, 23, 43-51.
- Darbre, P.D. and Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology*, 28, 561-578.
- David, J., Cohet, Y. and Fovillet, P., 1975. The variability between individuals as a measure of senescence: A study of the number of eggs laid and the percentage of hatched eggs in the case of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 10, 17-25.
- de Carvalho, C.M., Menezes, P.F.C., Letenski, G.C., Praes, C.E.O., Feferman, I.H.S. and Lorencini, M., 2012. In vitro induction of apoptosis, necrosis and genotoxicity by cosmetic preservatives: application of flow cytometry as a complementary analysis by NRU. *International Journal of Cosmetic Science*, 34, 176-182.
- Demirel, S. ve Zamani, A.G., 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3), 123-127.
- Dweck, A.D., 2011. Natural parabens. Natural Ingredient Resource Center, http://www.naturalingredient.org/Articles/Natural_Preservatives_original.pdf, (11.08.2012).
- EFSA, 2004. Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the Commission related to p-hydroxybenzoates (E 214-219). *The EFSA Journal* 83, 1-26.
- Eisenthal, A., Barbarsteyn, E., Gitstein, G. and Lifschitz-Mercer, B., 2006. Inhibition of lymphokine-activated killer cells generation *in vitro* by soluble factors released from mixed human tumor and peripheral blood mononuclear adherent cells culture. *Cancer Investigation*, 24 (1), 8-34.
- Emecen, G. ve Ünlü, H., 1995. Memelilerde pestisitlerin sitogenetik etkilerinin mikronükleus testi ile araştırılması. *Turkish Journal of Biology*, 19, 1-9.
- Epel, D., 1963. The effects of carbonmonoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg. *The Journal of Cell Biology*, 17, 315-319.
- Erdoğan, Y., 2008. Çeşitli gıda katkı maddelerinin *Allium cepa* L.'de mitoz bölünme, kromozomlar ve DNA miktarı üzerine etkileri. Y. Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sivas.

- Evans, H.J., 1976. Cytological Methods For Detecting Chemical Mutagens. Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection, Ed: Hollander A., Pleunum Press, New York, 1-29.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L., 1995. The Comet assay: A comprehensive review. Mutation Research, 339, 37-59.
- Falck, G., Catalan, J. and Norppa, H., 1997. Influence of culture time on the frequency and contents of human lymphocyte micronuclei with and without cytochalasin-B. Mutation Research, 392 (1-2), 71-79.
- Fenech, M. and Morley, A.A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research, 147 (1-2), 29-36.
- Fenech, M., 1993. The cytochinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. Environmental Health Perspectives, 101 (3), 101-107.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Research, 455 (1-2), 81-95.
- Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cossand, P. and de Saint B.G., 2000. Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid-amine reaction products. Toxicology in Vitro, 14 (5), 423-428.
- Fisher, J.S., Turner, K.J., Brown, D. and Sharpe, R.M., 1999. Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. Environmental Health Perspective, 107 (5), 397-405.
- Franca-Botelho, A.C., Honorio-Franca, A.C., Franca, E.L., Gomes, M.A. and Costa-Cruz, J.M., 2006. Phagocytosis of *Giardia lamblia* trophozoites by human colostral leukocytes. Acta Paediatrica, 95 (4), 438-443.
- Fred, H. and Timothy, J. B., 1997. An analysis of resource allocation in response to dietary yeast in *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology, 43 (8), 779-788.
- Freese, E., Sheu, C.W. and Galliers, E., 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. Nature, 241, 321-325.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. Mutation Research, 203, 297-308.
- Frei, H. and Würgler, F.E., 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. Mutagenesis, 11 (4), 315-325.
- Ganguly, B.B., 1995. Age-related variation in sister chromatid exchanges and cell cycle kinetics in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals. Mutation Research, 316 (4), 147-56.
- Giri, S., Gri, A., Sharma, G.D. and Prased, S.B., 2002. Mutagenic effects of carbosulfan, a carbamate pesticide. Mutation Research, 519, 75-82.
- Godfrey, D., 2010. Parabens: myth and reality. Cosmetics & Toiletries Magazine, 125 (3), 80-83.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. and Kale, P.G., 1984. Somatic mutation test in *Drosophila melanogaster*. Environmental and Moleculer Mutagenesis, 6, 153-188.

- Graf, U., Frei, H., Kagi, A., Katz, A.J. and Würgler, F.E., 1989. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. *Mutation Research*, 22, 359-373.
- Graf, U. and Würgler, F.E., 1996. The somatic white-ivory eye spot does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27, 219-226.
- Graf, U., Spano, M.A., Rincon, J.G., Abraham, S.K. and Andrade, H.H., 1996. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. *African News Letter*, 1, 9-13.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J. and Würgler, F.E., 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 402, 203-209.
- Guzman-Rincon, J. and Graf, U., 1995. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation and Recombination Test as a Biomonitor. *Biomonitoring and Biomarkers as Indicators of Environmental Change*. Ed: Butterworth, F.M., Corkum, L.D., Guzman-Rincon J., Plenum Press, New York, 169-181.
- Guzman-Rincon, J., Espinosa and J., Graf, U., 1998. Analysis of the *in vivo* nitrosation capacity of the larvae used in the wing somatic mutation and recombination test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 412, 69-81.
- Hasegawa, M., Nishi, Y., Ohkawa, Y. and Inui, N., 1984. Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured Chinese hamster cells. *Food and Chemical Toxicology*, 22 (7), 501-507.
- Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A., Navas, P. and Garcia-Herdugo, G., 1989. Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham. *Cytobios*, 57, 7-14.
- Hoberman, A.M., Schreur, D.K., Leazer, T., Daston, G.P., Carthew, P., Re, T., Loretz, L. and Mann, P., 2008. Lack of effect of butylparaben and methylparaben on the reproductive system in male rats. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 83 (2), 123-133.
- Houk, V.S., 1992. The genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research*, 277, 91-138.
- Hu, D.M., Cao, Y.Q., Chen, Z.Q. and Wang, N., 2006. Effect of exogenous cytokine stimulated decidual cells of early pregnancy on IgG secretion of B lymphocytes. *Journal of Southern Medical University/Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 26 (7), 1050-1052.
- Ishidate, M. Jr. and Odashima, S., 1977. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro*-a screening for chemical carcinogens. *Mutation Research*, 48 (3-4), 337-353.
- Ishidate, M. Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A., 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food and Chemical Toxicology*, 22 (8), 623-636.
- Ishiwata, H., Takeda, Y., Yamada, T., Watanabe, Y., Hosagai, T., Ito, S., Sakurai, H., Aoki, G. and Ushiyama, N., 1995. Determination and confirmation of methyl phydroxybenzoate in royal jelly and other foods produced by the Honey Bee. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 12 (2), 281-285.

- Jain, A.K. and Andsorbhoy, R.K., 1988. Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding Remarks. *Cytologia*, 53, 427-436.
- Johnson, D.R., 1982. The history of the 1906 pure food and drugs act and the meat inspection act. *Food Drug Cosmetic Law Journal*, 37, 5-9.
- Jung, R., Cojocel, C., Müller, W., Bottger, D. and Lück, E., 1992. Evaluation of the genotoxic potential of sorbic acid and potassium sorbate. *Food and Chemical Toxicology*, 30, 1-7.
- Kahlert, S., Neudling, S., van Eickels, M., Vetter, H., Meyer, R. and Grohe, C., 2000. Estrogen receptor rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 18447-18453.
- Karakaya, A.E., 1988. Gıda katkılarının toksikolojik yönden değerlendirme ilkeleri. Teknolojik, Toksikolojik ve Yasal Açıdan Gıda Katkıları. Seminer Notları, SEGEM, Ankara.
- Karakaya, A.E., 2011. Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontaminantları <http://www.turktox.org.tr/gida/index.php?p=gidaguvenligi> (10.05.2012)
- Kawaguchi, M., Morohoshi, K., Masuda, J., Watanabe, G., Morita, M., Imai, H., Taya, K. and Himi, T., 2009. Maternal isobutyl-paraben exposure decreases the plasma corticosterone level in dams and sensitivity to estrogen in female offspring rats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 71 (8), 1027-1033.
- Kayraldız, A. and Topaktaş, M., 2007. The *in vivo* genotoxic effects of sodium metabisulfite in bone marrow cells of rats. *Russian Journal of Genetics*, 43 (8), 905-909.
- Kelsey, K.T., Smith, T.J., Hammond, S.K., Letz, R. and Little, J.B., 1990. SCE in lymphocytes from styrene-exposed boat builders. *Mutation Research*, 241, 215-221.
- Kilcast, D. and Subramaniam, P. 2000. The stability and shelf-life of food. Woodhead Publishing Limited, 352 p, Cambridge, England.
- Kirkland, D.J. and Müller, L., 2000. Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutation Research*, 464, 137-147.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. and Van Hummelen, P., 1997. The *in vitro* micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research*, 392 (1-2), 19-30.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U. and Decordier I., 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicology Letters*, 140, 63-74.
- Koçak, Y. 2005. Sitrik asitin *Tinca tinca* [L., 1758] [Pisces: Cyprinidae] üzerindeki genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Koçak, S., 2006. Mayonezde mikrobiyolojik raf ömrü. Y. Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kurvink, K., Bloomfield C.D. and Cervenka J., 1978. Sister chromatid exchange in patients with viral disease. *Experimental Cell Research*, 113 (2), 450-453.
- Kwankua, W., Sengsai, S., Kuleung, C. and Euawong, N., 2010. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on root tip cells of *Allium cepa* and *Eurosia bicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 949-954.

- Latt, S.A., Allen, J., Bloom, S.E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. and Wolff, S., 1981. Sister-chromatid exchanges: A report of the Gene-tox Program. *Mutation Research*, 57, 17-62.
- Lazutka, J.R., Dedonyte, V. and Lekevicius, R.K., 1992. SCE in lymphocytes of normal and alcoholic subjects. *Experientia*, 48 (5), 508-12.
- Lemini, C., Silva, G., Timossi, C., Luque, D., Valverde, A., Gonzalez-Martinez, M., Hernández, A., Rubio-Póo, C., Chávez Lara, B. and Valenzuela, F., 1997. Estrogenic effects of *p*-hydroxybenzoic acid in CD1 mice. *Environmental Research*, 75, 130-134.
- Lemini, C., Hernandez, A., Jaimez, R., Franco, Y., Avila, M.E. and Castell, A., 2004. Morphometric analysis of mice uteri treated with the preservatives methyl, ethyl, propyl, and butylparaben. *Toxicology and Industrial Health*, 20, 123-132.
- Leung, K., Johannsson, G., Leong, G.M. and Ho, K.K.Y., 2004. Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocrine Reviews*, 25, 693-721.
- Levan, A., 1938. The effect of colchicine on root mitosis in *Allium*. *Hereditas*, 24, 471-486.
- Lewis, E.B. and Bacher, F., 1968. Method of feeding ethyl methanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila Information Service*, 43, 193.
- Liman, R., Ciğerci, I.H., Akyıl, D., Eren, Y. and Konuk, M., 2011. Determination of genotoxicity of fenamisosulf by *Allium* and comet tests. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 99, 61-64.
- Lindsley, D.L. and Zimm, G.G. 1992. *The Genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press, 1133 p, San Diego, USA.
- Loveday, K.S. and Latt, S.A., 1978. Search for DNA interchange corresponding to sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Research*, 5 (11), 4087-4104.
- Luca, D., Luca, V., Cotor, Fl. and Răileanu, L., 1987. *In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite. *Mutation Research*, 189 (3), 333-339.
- Lynch, A., Harvey, J., Aylott, M., Nicholas, E., Burman, M., Siddiqui, A., Walker, S. and Rees, R., 2003. Investigations into the concept of a threshold for topoisomerase inhibitor-induced clastogenicity. *Mutagenesis*, 18 (4), 345-353.
- Mac Gregor, J.T., Heddle, J.A., Hite, M. and Margolin, B.H., 1987. Guide lines for the conduct of micronucleus assay in bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, 189, 103-112.
- McCann, J., Spingarn, N.E., Kobori, J. and Ames, B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. *PNAS*, 72 (3), 979-983.
- Maffei, F., Forti, G.C., Castelli, E., Stefanini, G.F., Mattioli, S. and Hrelia, P., 2002. Biomarkers to assess the genetic damage induced by alcohol abuse in human lymphocytes. *Mutation Research*, 514 (1-2), 49-58.
- Mamur, S., 2009. Gıda katkı maddesi olarak kullanılan sodyum sorbat ve potasyum sorbatın insan periferik lenfositlerinde genotoksik etkileri. Y. Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Martin, J.M., Peropadre, A., Herrero, O., Freire, P.F., Labrador, V. and Hazen, M.J., 2010. Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells. *Mutation Research*, 702, 86-91.

- Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J.L. and Richardson, A.P., 1956. p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives. II. Acute and chronic toxicity in dogs, rats, and mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 45, 260-267.
- Meng, Z. and Zhang, L., 1994. Chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei induced human lymphocytes by sodium bisulfite (sulfur dioxide). *Journal of Sichuan University (Medical Science Edition) / Si Chuan Da Xue Bao*, 21 (1), 1-6.
- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E. and Lialiaris, T., 2008. Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (7), 2390-2393.
- Mukherjee, A., Giri, A.K., Talukder, G. and Sharma, A., 1988. Sister chromatid exchanges and micronuclei formations induced by sorbic acid and sorbic acid-nitrite *in vivo* in mice. *Toxicology Letters*, 42 (1), 47-53.
- Munzner, R., Guigas, C. and Renner, H.W., 1990. Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential, *Food and Chemical Toxicology*, 28 (6), 397-401.
- Müller, L. and Kasper, P., 2000. Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutation Research*, 464 (1), 19-34.
- Nakagawa, Y. and Moore, G., 1999. Role of mitochondrial membrane permeability transition in p-hydroxybenzoate ester-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 58, 811-816.
- Nakamura, S.I., Oda, Y., Shimada, T., Oki, I. and Sugimoto, K., 1987. SOS inducing activity of chemical carcinogens mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination with 151 chemicals. *Mutation Research* 192, 239-246.
- Natarajan, A.T., 2002. Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504 (1-2), 3-16.
- Negishi, T., Negishi, K., Ryo, H., Kando, S. and Hayatsu, S., 1988. The genotoxicity of N4-aminocytidine in the *Drosophila* wing spot test. *Mutagenesis*, 3 (1), 11-13.
- Neri, M., Fucic, A., Knudsen, L.E., Lando, C., Merlo, F. and Bonassi, S., 2003. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutation Research*, 544 (2-3), 243-254.
- Neves, E.R., Schäfer, S., Phillips, A., Canejo, J. and Macedo, M.F., 2009. Antifungal effect of different methyl and propyl paraben mixtures on the treatment of paper biodeterioration. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 63, 267-272.
- Nguyen, T., Clare, B., Guo, W. and Martinac, B., 2005. The effects of parabens on the mechanosensitive channels of *E. coli*. *European Biophysical Journal* 34, 389-395.
- Niraj, K.T., Kalyani, K.P. and Nabi, M.J., 1989. Genotoxicity of tartrazine studied in two somatic assays of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 224, 479-483.
- Oishi, S., 2001. Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 17, 31-39.
- Oishi, S., 2002. Effects of propylparaben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 1807-1813.

- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K. and Kano, I., 2001. ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER alpha and PR. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1225-1232.
- Öztaş, H., 2000. Hücre Biyolojisi (Sitoloji), Bakanlar Media, 275 s, Erzurum.
- Palitti, F.C., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A. and Fiori, M., 1982. Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cells of mice. *Mutation Research*, 103, 191-195.
- Parlak, Ş., 2007. Gıda koruyucu maddesi olan bifenil'in insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Peace, B.E. and Succop, P., 1999. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutation Research* 425 (2), 225-230.
- Pedersen, K.L., Pederson, S.N., Christiansen, L.B., Korsgaard, M. and Bjerregaard, P., 2000. The preservatives ethyl-, propyl-, and butylparaben are oestrogenic in an *in vivo* fish assay. *Pharmacology & Toxicology*, 86, 110-113.
- Pelevina, I.I., Aleshchenko, A.V., Gotlib, V.I., Kudriashova, O.V., Semenova, L.P. and Serebrianyi, A.M., 2005. Effect of low dose irradiation on the reaction of blood lymphocytes of individuals with the somatic diseases. *Radiatsionnaya Biologiya, Radioecologiya*, 45 (4), 412-415.
- Peng, X., Adachi, K., Chen, C., Kasai, H., Kanoh, K. and Misawa, N., 2006. Discovery of a marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (8), 5556-5561.
- Perry, P.E. and Wolff, S., 1974. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251 (5471), 156-158.
- Perry, P.E. and Evans, H.J., 1975. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258, 121-125.
- Perry, P.E. and Thomson, E.J., 1984. The Methodology of Sister Chromatid Exchanges. *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd ed., Eds: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., Elsevier, Amsterdam, 495-529.
- Rani, M.V.U. and Rao, M.S., 1991. In vitro effect of fenthion on human lymphocytes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47, 316-320.
- Rencüzoğulları, E., Kayraldız, A., İla, H.B., Çakmak, T. and Topaktaş, M., 2001. The cytogenetic effect of sodium metabisulfite, a food preservative in root tip cells of *Allium cepa* L. *Turkish Journal of Biology*, 25, 361-370.
- Rencüzoğulları, E., Parlak, S. and İla, H.B., 2008. The Effects of food protector biphenyl on sister chromatid exchange, chromosome aberrations, and micronucleus in human lymphocytes. *Drug and Chemical Toxicology*, 31 (2), 263-274.
- Rodeiro, I., Cancino, L., Gonzalez, J.E., Morffi, J., Garrido, G., Gonzalez, R.M., Nunez, A. and Delgado, R., 2006. Evaluation of the genotoxic potential of *Mangifera indica* L. extract (Vimang), a new natural product with antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 44 (10), 1707-1713.
- Rodriguez-Reyes, R. and Morales R.P., 2003. Sister chromatid exchange induction and the course of DNA duplication, two mechanisms of SCE induction by ENU and the role of BrdU. *Mutagenesis*, 18 (1), 65-72.

- Romagna, F., 1993. Mikrokerntest systeme. Mutations for schung und genetische Toxikologie, Ed: R. Fahrig. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 290-298.
- Rooney, D.E. and Czepulkowski B.H., 1986. Human cytogenetics: a practical approach. IRL Press Oxford, 224 p, England.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J. and Sumpter, J., 1998. Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. Toxicology and Applied Pharmacology, 153, 12-19.
- Saigo, K., Hashimoto, M., Kumagai, S. and Sugimoto, T., 1999. Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry, hematology analyzer or *in vitro* culture method. Rinsho Byori/The Japanese Journal of Clinical Pathology, 110, 124-130.
- Salehzadeh, A., Akhkha, A., Cushley, W., Adams, R.L., Kusel, J.R. and Strang, R.H., 2003. The antimitotic effect of the neem terpenoid azadirachtin on cultured insect cells. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 33 (7), 681-689.
- Saldamlı, İ., 1985. Gıda Katkı Maddeleri ve İngrediyentler. Önder Matbaası, 197 s, Ankara.
- Saldamlı, İ. ve Uygun, Ü., 2005. Gıda Kimyası/Gıda Katkı Maddeleri. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, 533-547.
- Sardaş, S. and Karakaya, A.E., 1990. Clastogenicity test; sister chromatid exchange. Journal of Faculty of Pharmacy of Gazi University, 7 (2), 91-104.
- Sarıkaya, R. ve Solak, K., 2003. Benzoik asitin *Drosophila melanogaster*' de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksitesinin araştırılması. Gazi Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi, 23 (3), 19-32.
- Sarıkaya, R. and Çakır, Ş., 2005. Genotoxicity of food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. Environmental Toxicology and Pharmacology, 20, 424-430.
- Sarıkaya, R., Çakır, Ş. and Solak, K., 2006. Effects of food preservatives on the longevity of *Drosophila melanogaster* (*mwhxflr*). Kastamonu Education Journal, 14, 173-184.
- Sarıkaya, R., Selvi, M. and Erkoç, F., 2012. Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test. Chemosphere, 88 (8), 974-979.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. and Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutation Research, 519 (1-2), 103-119.
- SCCP, 2005. Extended Opinion on Parabens, Underarm Cosmetics and Breast Cancer, SCCP/0874/05, Brussels: European Commission.
- SCCS (2010) (Scientific Committee on Consumer Safety), Opinion on parabens, 14 December 2010, revision of 22 March 2011. SCCS/1348/10, Revision 22 March 2011.
- Schaik, V.N. and Graf, U., 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressant in the wing somatic mutation and recombination test in *D. melanogaster*. Mutation Research, 260, 99-104.

- Schiffmann, D. and Schlatter, J., 1992. Genotoxicity and cell transformation studies with sorbates in Syrian Hamster embryo fibroblasts. *Food and Chemical Toxicology* 30, 669-672.
- Schlatter, J., Würgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Holliger, E. and Graf, U., 1992. The potential genotoxicity of sorbates: Effects on cell cycle *in vitro* in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*. *Food and Chemical Toxicology*, 30 (10), 843-851.
- Schulze, E. and Kirschner, S., 1986. Microtubule dynamics in interphase cells. *The Journal of Cell Biology*. 102, 1020-1031.
- Scialli, A.R., 2011. Reproductive effects of the parabens. *Reproductive Toxicology*, 32, 138-140.
- SCF, 1994. Reports of the Scientific Committee for Food (Thirty-fifth series). Opinion on phydroxybenzoic acid alkyl esters and their sodium salts expressed on 25 February 1994. European Commission, Food Science and Techniques, Directorate-General Industry, pp. 9-12.
- Scolnick, D.M. and Halazonetis, T.D., 2000. Chfr defines a mitotic stress checkpoint that delays entry into metaphase. *Nature*, 406, 430-435.
- Selby, P.B. and Olsen, W.H., 1981. Methods and criteria for deciding whether specific locus mutation-rate in mice indicate positive, negative or inconclusive result. *Mutation Research*, 203, 297-308.
- Semerdoğan, S., 2012. Gıda maddelerine katılan bazı sentetik azo gıda boyalarının *Drosophila melanogaster*'in Oregon R yabanıl ve *Vestigial* mutant soylarında larval mortalite ve ömür uzunluğu üzerine etkileri. Y. Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Shaw, J. and de Catanzaro, D., 2009. Estrogenicity of parabens revisited: impact of parabens on early pregnancy and an uterotrophic assay in mice. *Reproductive Toxicology*, 28, 26-31.
- Sinclair, B.J. and Roberts, S.P., 2005. Acclimation, shock and hardening in the cold. *Journal of Thermal Biology*, 30, 557-562.
- Singh, R.P. 1994. Scientific principles of shelf life evaluation. Shelf life evaluation of foods, 2nd ed, Ed: Man, D. and Jones, A. Aspen Publishers, Inc., USA, 3-22.
- Sircar, D., Roychowdhury, A. and Mitra, A., 2007. Accumulation of p-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucus carota*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1358-1366.
- Soni, M.G., Burdock, G.A., Taylor, S.L. and Greenberg, N.A., 2001. Safety assessment of propylparaben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 513-532.
- Soni, M.G., Carabin, I.G. and Burdock, G.A. 2005. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 43, 985-1015.
- Sorensen, J.G. and Loeschcke, V., 2002. Decreased heat shock resistance and down-regulation of hsp70 expression with increasing age in adult *Drosophila melanogaster*. *Functional Ecology*, 16, 379-384.
- Sox, T.E., 1997. Mechanisms of action of cosmetic preservatives. In: Brannan, D.K. (Ed.), *Cosmetic Microbiology: A Practical Handbook*. CRC Press LLC, Boca Raton, pp. 163-167.

- Sönmez, S., 1992. Yenidoğan hiperbilirubinemisinde uygulanan fototerapinin kromozomlar üzerine etkileri. Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Szabad, J., Soos, I., Polgar, G. and Hejia, G., 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test. Mutation Research, 113, 117-133.
- T.G.K., 2011. Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği (Madde 4/e).
- Tang, D., Warburton D., Tannenbaum S.R., Skipper P.I., Santella R.M., Cerejido G.S., Crawford F.G. and Perera F.B., 1999. Molecular and genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 8 (5), 427-31.
- Tanrıverdi, N., 1991. Kardeş Kromatid Değişimi (SCE). Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Terasaki, M., Makino, M. and Tatarazako, N., 2009. Acute toxicity of parabens and their chlorinated by-products with *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri* bioassays. Journal of Applied Toxicology, 29 (3), 242-247.
- Thierens, H., Vral, A. and de Ridder, L., 1996. A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency. Mutation Research, 360 (2), 75-82.
- Tohda, H., Horaguchi, K., Takahashi, K., Oikawa, A. and Matsushima, T., 1980. Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cells for study of sister chromatid exchange and their evaluation as a test system. Cancer research, 40, 4775-4780.
- Tucker, J.D., Auletta A., Micheal C.C., Kerry L.D., Kram D.J., Tice R.R. and Carrona A.V., 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox program. Mutation Research, 297 (2), 101-180.
- Tucker, J. and Preston, R.J., 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. Mutation Research, 365, 147-159.
- Türkoğlu, Ş., 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mutation Research, 626 (1-2), 4-14.
- Türkoğlu, Ş., 2008. Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. Food and Chemical Toxicology, 46 (6), 2035-2041.
- Uysal, H. ve Semerdöken, S., 2011. Sentetik gıda boyalarının *Drosophila melanogaster*'in Oregon R soyunda larval toksisite ve ergin ömür uzunluğu üzerine etkilerinin belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 4 (1), 71-87.
- Ünlü, H. and Bozcuk, A.N., 1979. Genetics of longevity in *Drosophila* I: The Effects of w, m and f mutant genes in various genotype combinations. Experimental Gerontology, 14, 117-124.
- Van Meeuwen, J.A., van Son, O., Piersma, A.H., de Jong, P.C. and van den Berg, M., 2008. Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. Toxicology and Applied Pharmacology, 230, 372-382.

- Van't Hof, J., 1968. The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristem. *Experimental Cell Research*, 51, 167-176.
- Viitanen, P.V., Devine, A.L., Khan, M.S., Deuel, D.L., Van Dyk, D.E. and Daniell, H., 2004. Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli* *ubiC* gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for p-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 136, 4048-4060.
- Vernole, P., Caporossi, D., Tedeschi, B., Melino, G., Porfirio, B., Bonmassar, E. and Nicoletti, B., 1988. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed to 1-p-(3-methyltriazeno) benzoic acid potassium salt. *Mutation Research*, 208 (3-4), 233-236.
- Vo, T.T. and Jeung, E.B., 2009. An evaluation of estrogenic activity of parabens using uterine calbindin-D9k gene in an immature rat model. *Toxicological Science*, 112 (1), 68-77.
- Vo, T.T., Yoo, Y.M., Choi, K.C. and Jeung, E.B., 2010. Potential estrogenic effect(s) of parabens at the prepubertal stage of a postnatal female rat model. *Reproductive Toxicology*, 29 (3), 306-316.
- Vock, E.H., Lutz, W.K., Holmes, P., Hoffmann, H.D. and Vamvakas, S., 1998. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, triton X-100 and gamma-irradiation. *Mutation Research*, 413, 83-94.
- Vogel, E.W., 1992. Tests for recombinogens in somatic *Drosophila*. *Mutation Research*, 284, 159-175.
- Vural, N. 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73, 659 s, Ankara.
- Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F. and Iliakis, G., 2005. DNA Ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Research*, 65 (10), 4020-4030.
- Wei, G.U., 2009. Toxicity and estrogen effects of methyl paraben on *Drosophila melanogaster*. *Food Science*, 30 (1), 252-254.
- Wilson III, D.M., Thompson, L.H., 2007. Molecular mechanism of sister chromatid exchange. *Mutation Research*, 616 (1-2), 11-23.
- Witorsch, R.J. and Thomas, J.A., 2010. Personal care products and endocrine disruption: a critical review of the literature. *Critical Reviews in Toxicology*, 40 (3), 1-30.
- Würgler, F.E. and Vogel, E.W., 1986. *In vivo* Mutagenicity Testing Using Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemical Mutagens: Principle and Methods for their Detection*, Ed: Serres, F.J. Plenum Press, New York, 1-72.
- Xiaoyun, Y., Amber, M.B., John A.R., Larry L.N. and Antonia, M.C., 2006. Parabens as urinary biomarkers of exposure in humans. *Environmental Health Perspectives*, 114 (12), 1843-1846.
- Yavuz, A., 2005. Benzol peroksidin insan periferik lenfositlerinde *in vitro* genotoksik etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Yavuz-Kocaman, A., Rencüzoğulları, E., İla, H.B. and Topaktaş, M., 2008. The genotoxic effect of potassium metabisulfite using chromosome aberration, sister chromatid exchange, micronucleus tests in human lymphocytes and chromosome

- aberration test in bone marrow cells of rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49, 276-282.
- Yılmaz, S., 2008. Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., Yüzbaşıoğlu, D. and Çelik, M., 2008. Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on *Allium* chromosomes. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17 (8a), 1029-1037.
- Yılmaz, S., Ünal, F. and Yüzbaşıoğlu, D., 2009. The *in vitro* genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes. *Cytotechnology*, 60, 55-61.
- Young, R.R., 2002. Genetic toxicology: web resources. *Toxicology*, 173, 103-121.
- Yurttagül, M., 1993. Hızlı Hazır Yemek (Fast Food) Sisteminde Kullanılan Katkı Maddeleri. Hızlı Hazır Yemek Sistemi (Fast Food). Eds: Akdağ, F., Arslan, P. Türkiye Diyetisyenler Derneği Yayını, Ankara, 23-28.
- Yurttagül, M. ve Ayaz, A., 2008. Katkı maddeleri: yanlışlar ve doğrular. Klavmat Matbaacılık, Sağlık Bakanlığı Yayınları No:727, 30 s, Ankara.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F. and Aksoy, H., 2006. Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 604 (1-2), 53-59.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. and Çelik, M., 2008. Genotoxicity testing of flucanazole *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research*, 649 (1-2), 155-160.
- Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K. and Speck, W., 1987. Salmonella mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. *Environmental Mutagenesis*, 9, 1-109.
- Zeiger, E., 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal, view. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371.
- Zengin, N., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S. and Aksoy, H., 2011. The evaluation of genotoxicity of two food preservatives: Sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 763-769.
- Zordan, M., Osti, M., Pesce, M. and Costa, R., 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 322, 111-116.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Samsun’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Amasya’da tamamladı. 1998 yılında girdiği 19 Mayıs Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Radyoloji Bölümü’nden 2000 yılında mezun oldu. 2000 yılında, Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’ne girerek 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji Bilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimine başladı. 2008 yılında yüksek lisansını bitirerek aynı yıl doktora öğrenimine başladı. Evli ve bir çocuk babası olup 2003 yılından beri Sağlık Bakanlığı’na bağlı olarak çalışmaktadır.