



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ADİPİK ASİT'İN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
TRADESCANTIA PALLIDA H. VE *ALLIUM CEPA* L.**

TÜRLERİNDE BELİRLENMESİ

Fatma Çisem KARABIYIK

Biyoloji Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADİPİK ASİT'İN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN
***TRADESCANTIA PALLIDA* H. VE *ALLIUM CEPA* L.**
TÜRLERİNDE BELİRLENMESİ

Fatma Çisem KARABIYIK

Biyoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 31/01/2018

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Cüneyt AKI

ÇANAKKALE

Fatma Çisem KARABIYIK tarafından Prof. Dr. Cüneyt AKI yönetiminde hazırlanan ve 31/01/2018 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “Adipik Asit’in Genotoksik Etkilerinin *Tradescantia pallida* H. ve *Allium cepa* L. Türlerinde Belirlenmesi” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliğı ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. Cüneyt AKI

.....

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Neslihan DEMİR

.....

Üye

Yrd. Doç. Dr. Tülay KILIÇASLAN AYNA

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Fatma Çisem KARABIYIK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın gerçekleştirilmesi esnasında benden desteğini esirgemeyen, yılların verdiği bilgi ve tecrübesine dayanarak bana her daim yol gösteren saygıdeğer hocam Prof. Dr. Cüneyt AKI' ya teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans hayatım boyunca varlığını ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, laboratuvar çalışmalarında bana klavuzluk ederek başarılı olmamı sağlayan, güzel yürekli hocam çok sevgili Arş. Grv. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK'e minnetimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisans hayatım da beni laboratuvar araştırmalarına yönlendirerek, araştırmayı sevmemi sağlayan ve her zaman danışmaktan çekinmediğim çok sevgili hocam Arş. Grv. Nihan AKINCI'ya desteği ve yardımları için teşekkürlerimi sunarım.

Lisans hayatımın bana kazandırdığı, kıymetli dostum Uzman Biyolog Nursel DURAN'a her daim desteğini ve güvenini benden esirgemediği için çok teşekkür ederim.

Hayatımın her anı boyunca benim yanımda olan, en büyük destekçim, hayattaki biricik varlığım canım annem Ayşe DAĞCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma Çisem KARABIYIK
Çanakkale, Ocak 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

GKM	Gıda katkı maddesi
AA	Adipik Asit
SAA	Sentetik Adipik Asit
KBİT	Kök Büyümesi İnhibisyon Testi
KA	Kromozomal aberasyon
MI	Mitotik indeks
Trad	<i>Tradescantia</i>
MN	Mikronükleus
STM	Stamen Tüyü Mutasyonu
FAO	Dünya Tarım Örgütü
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
JECFA	Gıda Katkılarında Birleşmiş FAO/WHO Uzman Komitesi
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
ADI	Kabu Edilebilir Günlük Alım Miktarı
NOAEL	Gözlenmeyen Yan Etki Seviyesi
IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
QSAR	Nicel Yapı ve Aktivite İlişkisi Analizi
EC ₅₀	Kimyasal maddenin deney canlılarının %50'sinde etkili dozu
µg	Mikrogram
mg	Miligram
kg	Kilogram
g	Gram
mL	Mililitre
L	Litre
mM	Milimolar
µM	Mikromolar
%	Yüzde oranı
°C	Santigrat derece

ÖZET

ADİPİK ASİT'İN GENOTOKSİK ETKİLERİNİN *TRADESCANTIA PALLIDA* H. VE *ALLIUM CEPA* L. TÜRLERİNDE BELİRLENMESİ

Fatma Çisem KARABIYIK

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman Prof. Dr. Cüneyt AKI

31/01/2018, 64

Yapılan bu tez çalışmasında, Adipik Asit'in (AA) genotoksik etkileri “*Allium cepa* L. Kök Ucu Hücre Testi” ve “*Tradescantia pallida* H. Stamen Tüyü Testi” kullanılarak incelenmiştir. Uygulama dozları “Kök İnhibisyon Testi” uygulanarak bulunan EC₅₀ değerine göre belirlenmiştir ve bu dozlar 18.75 mg/L, 37.5 mg/L ve 75 mg/L' dir.

Belirlenen konsantrasyondaki çözeltiler, *A. cepa* kök uçlarına 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanarak etkileri mikroskopik olarak incelenmiş ve istatistiksel analiz gerçekleştirilerek yorumlanmıştır. Elde edilen sonuçlar AA konsantrasyonu ve uygulama süresi arttıkça mitotik indeksin azaldığını ve kromozomal aberasyon rastlanma sıklığının arttığını göstermiştir. Kromozomal aberasyonlar incelendiğinde tüm AA uygulamalarda en sık gözlenenler; C-mitoz (% 43.75), metafazda ekvatorial tabla kayması (% 25.3), anafazda kutup kayması (% 15), telofazda kutup kayması (% 14.7) olarak belirlenmiştir.

Pembe mutasyonların belirlenebilmesi için 18.75 mg/L, 37.5 mg/L, 75 mg/L'lik çözeltiler *T. pallida* gruplarına 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanarak incelenmiştir. Her bir uygulama grubu için 3000 stamen hücresi incelenmiş fakat pembe mutasyonlu hücre oluşumu görülmemiştir. Bunun üzerine belirlenen etki konsantrasyonlarının üzerine çıkılarak 95 mg/L ve 115 mg/L konsantrasyonlarında AA çözeltiler hazırlanarak uygulama gerçekleştirilmiştir. 95 mg/L'lik çözelti *T. pallida*'ya uygulandığında 3000 hücre içerisinde pembe mutasyon oluşumları şöyledir; 24 saatlik uygulamalarda pembe mutasyon oluşmazken, 48 saatte 19 adet ve 72 saatte 79 adet pembe mutasyonlu hücre belirlenmiştir.

AA kullanımının yaygın olduğu gıda, ilaç ve kozmetik sanayide kullanım miktarına dikkat edilmesinin ve uzman kişiler tarafından kullanılmasının gerekliliği ortaya koyulmuştur. Araştırmamız sonuçları ile AA'in maruz kalınan konsantrasyon ve süreye

bağlı olarak canlı hücreler üzerinde genotoksik ve sitotoksik etki gösterebileceği belirlenmiştir

Anahtar sözcükler: Adipik Asit, *Allium cepa*, Mitotik İndeks, Kromozomal Aberasyon, *Tradescantia pallida*, Pembe Mutasyon



ABSTRACT

DETERMINATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF ADIPIC ACID ON *TRADESCANTIA PALLIDA* H. AND *ALLIUM CEPA* L. SPECIES

Fatma Çisem KARABIYIK

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Science

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor: Prof. Dr. Cüneyt AKI

31/01/2018, 64

In this research, the genotoxic effects of Adipic Acid (AA) were examined by using "*Allium cepa* L. Root Tip Test" and "*Tradescantia pallida* H. Stamen Hair Mutation Test". The administration doses were determined according to the EC₅₀ value obtained by applying the "Root Inhibition Test" and these doses were 18.75 mg/L, 37.5 mg/L and 75 mg/L.

The solutions of the determined concentrations were applied to the root tips of *Allium cepa* L. for 24, 48 and 72 hours and the effects were examined microscopically and interpreted by performing statistical analysis. Our results showed that when the AA concentration and exposure time increased, the mitotic index decreased and the incidence of chromosomal aberrations increased. When chromosomal abnormalities are examined, the most common findings in all AA applications are; C-mitosis (43.75 %), equatorial plate shift in metaphase (25.3 %), pole shift in the anaphase (15 %) and pole shift in telophase (14.7 %). For the observation of pink mutation 18.75 mg/L, 37.5 mg/L, 75 mg/L, 95 mg/L and 115 mg/L doses of AA were applied to *T. pallida* plants for 24, 48 and 72 hours. When the 95 mg/L dose was applied to *T. pallida*, pink mutation event have been observed as 19 and 79, after the 48 and 72 hours, respectively.

The results of our research indicate that AA may show genotoxic and cytotoxic effects on living cells depending on the concentration and time of exposure. Therefore, people need to pay attention to the use of AA.

Keywords: Adipic Acid, *Allium cepa*, Mitotic Index, Chromosomal Aberration, *Tradescantia pallida*, Pink Mutation Event.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
BÖLÜM 1	1
GİRİŞ	1
1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihsel Geçmişi	2
1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Denetlenmesi ve Kontrol Edilmesi	2
1.3. Gıda Katkı Maddesi Tanımı ve Sınıflandırılması	3
1.3.1 GKM'leri Kullanırken Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar	4
1.3.2. E Kodu (European Code) Nedir?	5
1.3.3. Adipik Asit (E355)	5
1.3.4. Gıda Katkı Maddesi Olarak AA'in Kullanım Alanları	7
1.4. Bitkisel Genetik Toksikite Testleri	8
BÖLÜM 2	10
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	10
2.1. Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Çalışmalar	10
2.2. Adipik Asit ile İlgili Çalışmalar	13
2.3. <i>Allium cepa</i> L. ve <i>Tradescantia pallida</i> İle İlgili Çalışmalar.....	16
BÖLÜM 3	21
MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Bitkisel Materyal	21
3.1.2. Test Kimyasalları.....	24
3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanma Prosedürleri	25
3.2.1. Adipik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması	25
3.2.2. Farmer Fiksatifli Hazırlanması	25
3.2.3. 1N HCL Asit Hazırlanması	25
3.2.4. Karminik Asit (Asetokarmin) Hazırlanması	25
3.3. Yöntem.....	25
3.3.1. Kök Büyümesi İnhibisyon Testi ve EC ₅₀ Değerinin Hesaplanması	25

3.3.2. <i>Allium cepa</i> Çimlendirilmesi ve Adipik Asit (AA) Uygulaması.....	27
3.4. <i>Allium cepa</i> L. Mitotik Aktivite ve Kromozom İncelemesi.....	28
3.4.1. Fiksasyon.....	28
3.4.2. Maserasyon.....	28
3.4.3. Boyama ve Preparat Hazırlanması	28
3.4.4. Mikroskopik Analizler.....	29
3.4.5. Mitotik Aktivite ve Kromozomal Aberasyon (KA) İndeksinin Hesaplanması ..	29
3.4.6. İstatiksel Analiz	29
3.5. <i>Tradescantia pallida</i> H. Çoğaltılması ve Adipik Asit (AA) Uygulaması.....	30
3.5.1. <i>Tradescantia pallida</i> Stamen Tüyü Mutasyon Analizi	30
BÖLÜM 4.....	31
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	31
4.1. Kök Büyümesi İnhibisyon Testi (KBİT) Bulguları	31
4.2. Mitotik İndeks Bulguları	33
4.3. Kromozomal Aberasyonlar	37
4.3.1. Kromozomal Aberasyonlara Ait Görseller.....	37
4.3.2. Kromozomal Aberasyon Bulguları.....	41
4.4. <i>Tradescantia pallida</i> H. Stamen Tüyü Analizi Bulguları	44
4.4.1. Trad-STM Görselleri	44
4.4.2. Trad- STM Bulguları	48
4.5. Tartışma.....	49
BÖLÜM 5.....	53
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. <i>Allium cepa</i> L. varyetelerine ait karyotip görüntüleri (Ramesh, 2015).....	21
Şekil 3.2. Çiçeklenme Mevsimine ait <i>Tradescantia pallida</i> görüntüsü.....	22
Şekil 3.3. <i>Tradescantia pallida</i> . Genel Bitki Görüntüsü.....	23
Şekil 3.4. Adipik Asit Ambalajı.....	24
Şekil 3.3.1. Seçilen Soğan Örnekleri.....	26
Şekil 3.3.2. KBİT Uygulaması ve EC ₅₀ belirlenmesi: Çimlenmiş Soğan Görüntüleri.....	27
Şekil 4.1. AA Çözeltilerinin <i>Allium cepa</i> Kök Büyümesi Üzerine Etkisi.....	32
Şekil 4.2. <i>Allium cepa</i> L. KBİT Sonucu Ölçülen Kök Uzunlukları.....	33
Şekil 4.3. 24 Saatlik AA Uygulaması Sonrası Mitotik İndeks Değişimi	34
Şekil 4.4. 48 Saatlik AA Uygulaması Sonrası Mitotik İndeks Değişimi.....	35
Şekil 4.5. 72 Saatlik AA Uygulaması Sonrası Mitotik İndeks Değişimi.....	35
Şekil 4.6. 24,48 ve 72 Saatlik AA Uygulaması Sonrası Mitotik İndeks Değişimi.....	36
Şekil 4.7. Kontrol A: Profaz, B: Metafaz, C: Anafaz, D: Telofaz.....	37
Şekil 4.8. AA 24 Saat 37,5mg/L Uygulaması A: Metafazda ploidi ve plak kayması, B: Vagrant kromozom, C: C- Mitoz, D: Lagard kromozom, E: Telofazda yapışkanlık, F: Anafazda köprü oluşumu	38
Şekil 4.9. AA 48 saat 37,5 mg/L uygulaması A: Anafazda tripolar oluşumu ve deforme, B: Metafazda eş ayrılmama, C: Vagrant kromozom, D: Kontraksiyon E: Anafazda köprü oluşumu ve yapışkanlık, F: Star kromozom.....	39
Şekil 4.10. AA 72 saat 37,5 mg/L uygulaması A: Spiral çözünme, B: Anafazda köprü oluşumu ve deformasyon, C: Düzensiz Telofaz ve kromozom kopması, D: Düzensiz anafaz, E: Anafazda köprü oluşumu, F: Ploidi.....	40
Şekil 4.11. 24 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri.....	42
Şekil 4.12. 48 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri.....	42
Şekil 4.13. 72 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri.....	43
Şekil 4.14. 24, 48 ve 72 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri.....	43
Şekil 4.15. <i>Tradescantia pallida</i> H. çiçeği stereo mikroskop görüntüsü.....	44
Şekil 4.16. Negatif kontrol grubu. Renksiz stamen hücreleri.....	44
Şekil 4.17. Pozitif kontrol grubu. Pembe mutasyonlu stamen hücreleri.....	45
Şekil 4.18. 24 saat 75 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri.....	45
Şekil 4.19. 48 saat 75 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri.....	46
Şekil 4.20. 72 saat 75 mg/L AA uygulaması. Renksiz Stamen Hücreleri.....	46
Şekil 4.21. 24 saat 95 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri.....	47
Şekil 4.22. 48 saat 95 mg/L AA uygulaması. Pembe mutasyonlu hücreler.....	47
Şekil 4.23. 72 saat 95 mg/L AA uygulaması. Pembe mutasyonlu hücreler.....	48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. JECFA Tarafından Güvenlik/Risk Değerlendirilmesi Yapılan Gıdalarda Bulunabilecek Maddeler.....	3
Çizelge 1.2. Türk Gıda Kodeksi, GKM Yönetmeliğinde Belirtilen Gıdalarda, GKM'lerinde ve Gıda Enzimlerinde Kullanılan GKM'leri Fonksiyonel Sınıfları (Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme Yayın Genel Müdürlüğü, 2013).....	4
Çizelge 1.3. E Kodlarına Göre GKM'nin Sınıflandırılması (Çalışır ve ark., 2003).....	5
Çizelge 1.4. AA Genel Özellikleri (PubChem Open Chemistry Database, 2017).....	8
Çizelge 4.1. AA için Belirlenen EC ₅₀ Değerleri.....	31
Çizelge 4.2. KBİT Sonunda Ölçülen Kök Uzunlukları	32
Çizelge 4.3. AA Uygulaması Sonucu Mitotik İndeks Verileri.....	33
Çizelge 4.4. AA'in Mitotik İndeks Üzerindeki Etkisinin Yüzdellik Gösterimi.....	34
Çizelge 4.5. AA Uygulaması, Z İstatistiği Anlamlılık Düzeyleri.....	36
Çizelge 4.6. AA Uygulamalarının, Kontrol Grubuna Göre Anlamlılık Düzeyleri.....	41
Çizelge 4.7. Uygulamalara Göre Belirlenen Pembe Mutasyonlu Hücreler.....	49

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünya da canlılığın oluşumundan bu yana hayatta kalabilmek adına beslenmenin önemi yadsınamaz niteliktedir. Besin zincirinin en alt katmanından, en üst katmanına kadar canlıların her biri besin için her zaman rekabet halinde bulunmuş ve çoğu kez yaşamlarını sürdürebilmeleri ve bununla beraber nesillerini devam ettirebilmeleri besinin varlığı ile olmuştur. Bu nedenle doğadaki bazı canlılar besinleri sadece tüketmekle kalmamış aynı zamanda daha sonra kullanmak üzere saklama ve depolama yöntemlerine başvurmuştur.

Bu davranışın biraz farklı bir örneği insanlarda karşımıza çıkmaktadır. Besinlere yapılan tuzlama, tütsüleme, sirke ile salamura yapma ve yanmış kükürtle kürlenme işlemleri ile besinlerin bozulmasının önlemeye çalışarak bir çeşit konserve oluşturmuşlar ve bu da en ilkel haliyle olsa gıda katkı maddelerinin keşfedilmesine ve kullanılmasına neden olmuştur.

İnsan topluluk halinde yaşamayı benimseyen ve hayatının idamesini bu şekilde gerçekleştirebilen sosyal bir varlıktır. Bu durum bireyler için önemlilik arz etmekle beraber dünya nüfusundaki artış bazı olumsuz durumlara sebebiyet vermektedir. Bu olumsuzlukların başında besin kaynaklarının sınırlı olması gelmektedir. Bu sınırlamalar 19. yüzyılda besin üretiminin endüstriyel bir dal oluşturmasına ve gıda sanayisinin gelişimine neden olmuştur. Besin sektöründeki sanayileşme daha kısa sürede daha fazla besine ulaşımı kolaylaştırmış ve hatta normalde belirli aylarda yetişen meyve ve sebzelere yılın her mevsiminde erişime olanak sağlamıştır.

Gıda sanayisinin gelişmesi birçok olumlu etkiye sahipken bazı olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir. Bunlara verilebilecek en önemli örnek “Gıda Katkı Maddelerinin” kullanılmasıdır. Kullanılan teknoloji, paketlenme yöntemi ve besinlerin dayanıklılık süresi gibi benzeri etmenler gıda katkı maddelerini kullanılmasını neredeyse zorunlu kılmaktadır.

Kullanılan gıda katkı maddeleri (GKM); insan sağlığı (Erkmen, 2010; Andra ve Makris, 2012), özellikle de çocuk sağlığı (Doğruyol, 2006; Connolly ve ark., 2010) ve çevre güvenliği (Dilek, 2013) açısından risk faktörü oluşturmakla beraber, kullanılan katkı miktarlarının toksik ve kanserojenik olabilme potansiyeli bakımından incelenmesi ve araştırılması son derece önemlidir.

1.1. Gıda Katkı Maddelerinin Tarihsel Geçmişi

GKM tarihi, insanın beslenmeyi öğrenmesinin tarihi kadar eskidir. İlk katkıların bitkisel materyallerden oluştuğu bilinmekle beraber, daha sonra ki zaman sürecinde insanlar deneme yanılma yoluyla M.Ö. 3000' li yıllarda etin tuzlandığında bozulmadığını, M.Ö 900'lü yıllarda odun tütsüsü yapıldığında bozulmanın engellenmesinin yanı sıra lezzet ve aromanın arttığını bulmuşlardır. Ortaçağa gelindiğinde bunlara ek olarak nitrat etin rengine canlılık katması nedeniyle kullanılmaya başlandı. M.Ö 50. yy' da baharatlar keşfedilmeye başlanmıştır.

Ayrıca peynir balmumuna sarılarak korumaya alınmış (Boğa, 2010), sütü korumak için formaldehit ve eti korumak için boraks gibi son derece zararlı kimyasallarda gıda katkıları olarak kullanılmıştır. Ticari ilk kayıttın Kalsiyum Fosfata ait olduğu bildirilmekle beraber, gıdaları renklendirmek amacıyla civa, arsenik, kurşun gibi ağır metallerin Mısırlılar tarafından 3500 yıl önce kullanıldığına dair kayıtlar mevcuttur (Erdoğan Yeliz, 2008). 1856 yılında ilk kez gerçek bir gıda renklendirici olarak "Anilin Moru" kullanılmıştır.

1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Denetlenmesi ve Kontrol Edilmesi

GKM ile ilgili uluslararası çalışmalar, Birleşmiş milletlere bağlı Gıda Tarım Örgütü (FAO - Food and Agriculture Organization) ve Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO -World Health Organization) ortaklaşa yürüttüğü, bilimsel uzman komitesi olan JECFA (JECFA - Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) tarafından yürütülmektedir.

JECFA ilk olarak 1956 yılında bazı GKM'lerinin, güvenliğini araştırmak için bir araya gelmiştir. Günümüzde de Uluslararası Gıda Kodex Komisyonu tarafından oluşturulan, Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesi gıdalarda bulunabilecek veya gıdaları enfekte edebilecek düşünülen 2.500'den fazla GKM, yaklaşık 40 kirletici madde ve doğal olarak oluşan toksik maddeleri ve yaklaşık 90 veteriner ilaçlarının kalıntılarını değerlendirmiştir.

Gıdalardaki bu maddelerin; güvenlik / risk değerlendirilmesi, etkilerini belirlemesi için çalışmalar yaparak söz konusu maddeleri uzun süreli olarak deney hayvanları üzerinde olası kanserojenik, teratojenik, mutajenik ve toksikolojik etkilerini incelemektedir. JECFA tarafından güvenlik/ risk değerlendirmesi yapılan gıdalarda bulunabilecek maddeler Çizelge 1.1.'de belirtilmiştir (Food and Agriculture Organization, 2017).

Çizelge 1.1. JECFA tarafından güvenlik / risk değerlendirmesi yapılan gıdalarda bulunabilecek maddeler

- Gıda Katkı Maddeleri (İstemli olarak eklenen)
- İşleme Yardımcıları
- Aroma Ajanları
- Hayvan Ürünlerindeki Veteriner İlaç Kalıntıları
- Kirleticiler
- Doğal Toksinler

1.2.1 Gıda Katkı Maddeleri Uzmanlar Komitesi (JECFA)'nın Çalışma Alanları

(World Health Organization, 2016)

- Deney hayvanları üzerindeki toksikolojik çalışmalar yapılması ve allerji-intolerans durumlarını araştırılması, (gerekli durumlarda insan deneyleri yapılması)
- GKM'lerinin en yüksek dozlarını belirlenmesi ve onaylanması,
- GKM ile ilgili listelerin belirlenmesi ve değerlendirilmesi,
- GKM' nin analizinde kullanılan metotların standardize edilmesi
- Maddelerin absorpsiyon, dağılım ve atılım gibi biyokimyasal özelliklerinin ortaya koyulması,
- GKM'lerin sağlık üzerindeki etkileri konusunda çalışmalar yürütülmesi, analizler tamamlandığında ADI (Acceptable Daily Intake-Günlük Tüketilebilir Miktar) ve NOAEL (No Advers Effect Level-Yan Etkinin Olmadığı Seviye)'in belirlenmesi gibi önemli çalışmalar yürütmektedirler.

Ülkemizde GKM kullanımına dair güvenli doz aralıkları “Türk Gıda Kodeksi” tarafından resmi olarak bildirilmektedir. Ancak bu dozların çeşitli kanserojenite ve toksisite testleri ile incelenmesi, sonuçlarının değerlendirilmesi olası tehlike ve risk faktörlerinin önüne geçilmesi için oldukça gerekli ve önemlidir.

1.3. Gıda Katkı Maddesi Tanımı ve Sınıflandırılması

Kullanılan GKM'leri doğal olarak gıdalarda bulunabilirken, sentetik olarak üretilmekte ve bu şekilde besinleri lezzetlendirmek ve korumak amacıyla kullanılmaktadır. Sentetik gıda katkı maddeleri, doğal olanları taklit eden kimyasallardır. Kimyasal ve fiziksel olarak aynı özelliklere sahiptirler (Carocho ve ark., 2014).

Resmi gazetede yayımlanan (30 Haziran 2013 Pazar) Türk Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Yönetmeliği Madde 4'te GKM Tanımı şöyledir. "Besleyici değeri olsun veya olmasın, tek başına gıda olarak tüketilmeyen ve gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, muamele, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu kendisinin ya da yan ürünlerinin, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olması beklenen maddelerdir (Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, 2013).

1.3.1 GKM'leri Kullanırken Dikkat Edilmesi Gereken Noktalar

- İnsan sağlığına zararlı olup olmadığı araştırılmalı ve ilgili yasalar belirlenmelidir.
- Kimyasallar kullanılan teknolojik cihazlar veya yöntemler gibi mecburi durumlar olmadığı sürece kullanılmamalıdır.
- Hangi kimyasalın, hangi besinlerde kullanılabileceğine ve miktarlarına resmi olarak izin verilen değerler göz önünde tutularak karar verilmelidir.
- Kullanılan GKM'leri besinin var olan besin değerini azaltıcı etki göstermemelidir.
- Gıda katkı maddeleri besinlerin kalitesinin ve yapısının korunması amacıyla kullanılmalı, kalitesi düşük besinlerin cazibesini arttırmak gibi kötü amaçlarda kullanılmamalıdır (Yurttagül ve Ayaz, 2008).

Çizelge 1.2. Türk gıda kodeksi, GKM yönetmeliğinde belirtilen gıdalarda, GKM'lerinde ve gıda enzimlerinde kullanılan GKM'si fonksiyonel sınıfları (Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme Yayın Genel Müdürlüğü, 2013)

Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonel Sınıfları	
Tatlandırıcılar	Asitler
Renklendiriciler	Asitlik düzenleyiciler
Koruyucular	Topaklanmayı önleyiciler
Antioksidanlar	Hacim arttırıcılar
Taşıyıcılar	Emülgatörler
Kabartıcılar	Metal bağlayıcılar
Kıvam arttırıcılar	Un işlem maddeleri
Emülsifiye edici tuzlar	Aroma arttırıcılar
Köpük oluşturunucular	Sertleştiriciler
Jelleştiriciler	Stabilizatörler

1.3.2. E Kodu (European Code) Nedir?

Alanında uzman sağlık ve ilgili gıda otoriteleri JECFA, EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi), FDA (ABD Gıda ve İlaç İdaresi) tarafından GKM'leri için gerekli güvenlik testleri yapılarak, maksimum kullanma düzeyleri ve spesifikasyonları belirlenerek Avrupa Birliği tarafından belirlenen kodlardır.

GKM'leri için belirlenen E kodları uluslararası özellikte olup, E harfi ve 3 rakamdan oluşmaktadır. Dünyanın bütün ülkelerinde bu kodlarla tanınarak oluşabilecek karışıklıkların engellenmesi ve gıda güvenliğinin sağlanması açısından büyük bir öneme sahiptir.

Çizelge 1.3. E kodlarına ve fonksiyonlarına göre GKM'leri sınıfları (Çalışır ve ark., 2003)

E Kodları	Fonksiyonları
E 100 - 181	Renklendiriciler
E 200 - 290	Koruyucular
E 296 - 385	Antioksidanlar ve Asitlik Düzenleyiciler
E 400 - 495	Koyulaştırıcılar, Emülgatörler, Stabilizatörler
E 500 - 585	İncelticiler
E 620 - 640	Lezzet Arttırıcılar
E 900 - 969	Tatlandırıcılar

1.3.3. Adipik Asit (E 355)

Adipik asit (AA) fiziksel olarak beyaz, tanecikli bir yapıya sahiptir. Düz zincir formda ve 6 karbon bulunduran bu bileşiğin IUPAC tarafından belirlenmiş kimyasal adı "Hekzandioik Asit" veya "1,4-butandikarboksilik Asit"tir. Yapısında iki adet karboksil grubu bulundurması nedeniyle genel olarak "Dikarboksilik Asit" olarak sınıflandırılmaktadır.

Bitkisel kaynaklı olarak şeker pancarı (*Beta vulgaris*) ve şeker kamışı (*Saccharum officinarum*) suyunda (OECD, 2004), *Morinda citrifolia*'nın olgunlaşmış meyvelerinde (Farine ve ark., 1996), Yeni Zelanda'da bulunan geniş yapraklı bir orman ağacı türü olan *Knightia excelsa* (Hanımeli – NZ Honeysuckle) nektarlı çiçeklerinden elde edilen balda (Wilkins ve ark., 1995), *Oryza sativa* (çeltik) yetiştirilen sulak alanlarda adipik asit bulunduğu bildirilmiştir. Hayvansal yağlardan çok nadir olarak elde edilebilir ve ayrıca insan vücudunda metabolik olaylar sonucunda yan ürün olarak üretilerek, boşaltım ürünü olarak idrarla birlikte atılabilen bir maddedir (Kaluzna-Czaplinska ve ark., 2011).

Bu nedenle AA genellikle sentetik yollarla elde edilmekte ve ticari formlarının çoğu sikloheksanol (% 93) ve sikloheksanon (% 7) karışımından elde edilen KA-yağından

üretilmektedir. İlk kayıtlar AA'in 1986'dan beri sentetik olarak üretildiğini ve 1995'te ihracat rakamlarının 2 milyar lira olduğunu ve günümüze kadar artarak geldiği bildirmektedir (Pubchem Open Chemistry Database, 2017).

Sentetik olarak üretilen AA'in % 90'ı sanayide elyaf ve plastikler üretimi için nylon 6,6 polimerinin elde edilmesinde kullanılır. Naylon protein benzer bir yapıya sahiptir bu nedenle halılarda, otomobil dış lastiklerinde ve giyim eşyalarında lifler içerisinde daha fazla işleminden geçirilmeye elverişlidir.

AA türevleri olan alkil halidler, anhidritler, esterler, amidler ve nitriller; tatlandırıcı ajanlar, iç plastikleştiriciler, böcek ilaçları (Flors ve ark., 2003), boyalar, tekstil muamele ajanları, rigid ve esnek köpükler, tel kaplayıcılar, yapıştırıcılar, sentetik yağlar, fungusitler (Vicedo ve ark., 2006), cerrahi süturlar (Köhle ve Demir, 2003), şampuanlar, çamaşır deterjanları, bakım kremleri (Household Products Database, 2017) ve tıbbi ilaçlar (Neutec İlaç, 2017) gibi ürünlerin üretilmesi ve şekillendirilmesinde kullanılmaktadır.

Sentetik Adipik Asitin (SAA) fazla kullanım alanının olması, doğru orantılı olarak üretiminde artmasına neden olmaktadır. Fakat bu üretim prosesleri sırasında ortaya çıkan gazlar atmosfere salınmakta ve buda CO₂ emisyonu incelendiğinde atmosfer kirliliği açısından risk oluşturmaktadır. Bu zararlı etkiler AA üretimi için alternatif yöntemlere başvurmayı gerektirmiş ve biyolojik olarak sentezlenebilmesi için araştırmalara başlanmıştır.

2011 yılında yapılan ve patenti alınan bir çalışmada *Candida*, *Acinetobacter*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Xanthobacter*, *Aspergillus*, *Escherichia*, *Streptomyces*, *Serratia*, *Salmonella*, v.b gibi birçok mikroorganizmanın türlerine ait suşlarda, yapılan genetik manüplasyonlar sayesinde metabolik yollarda değişiklikler meydana getirilerek AA'in biyosentezi sağlanmıştır (Picataggio ve Beardslee, 2012). Yabani tip bir mikroorganizma olan *Thermobifida fusca* B6 suşuyla yapılan bir çalışmada, mikroorganizmaya Tfu-1647 proteini eklendiğinde iz miktarda AA üretimi sağlanırken, protein yokluğunda hiçbir şekilde AA oluşmadığı gösterilmiştir (Deng ve Mao, 2015). Diğer bir çalışmada *Pseudomonas putida* KT2440 suşu kullanılarak lignoselülozdan AA biyosentezi gerçekleştirilmiştir (Vardon ve ark., 2015).

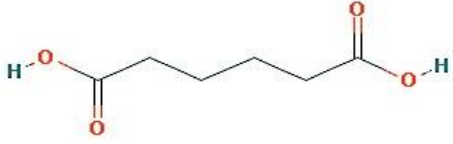
1.3.4. Gıda Katkı Maddesi olarak AA'in kullanım alanları;

- Donmuş sütlü tatlılar ve pudingler gibi jelatin yapıdaki ürünlerde gıda kalitesini arttırıcı (WHO, 1967),
- Meşrubatlarda, çeşnilerde ve lezzet vericilerde ekşilik-mayhoşluk sağlayıcı,
- Et suları, et ürünleri, atıştırma ve çerez gibi gıdalarda kalite kaybına karşı koruyucu,
- Kuru toz karışımlarında ve meyve lezzetli şekerlerde düzgün yapı ve hafif ekşi aroma sağlamak ile asitliği düzenleyici (Akbel Kimya, 2017),
- Kabartma tozlarında kabartıcı, eritme peynirlerde erime karakteristiği oluşturucu,
- Üzüm aromalı gıdalara kalıcı tat ve koku verici,
- Kalsiyum karbonatlı antiasitlerde şekerlendirici (The Chemical Company, 2017),
- Tavuk gibi kanatlı hayvan etlerinde kontaminasyonu ve bozulmayı engelleyici (Şanlı ve ark., 1996),
- Sebze konserveçiliğinde, gıda endüstrisinde ve şekerleme imalatında aroma ekstraktlarında asitlendirici özelliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır.

AA Türk Gıda Kodeksi'nde (30027 sayılı resmi gazete) "Gıda Maddelerinde Kullanılan Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Katkı Maddeleri" olarak sınıflandırılan grupta yer almaktadır. Kimyasalın etkili olabilmesi için saflığının % 99'dan az olmaması gerekli olduğu belirtilmiştir (Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü, 2017).

AA ile ilgili genel bilgiler Çizelge 1.4.'te verilmiştir.

Çizelge 1. 4. AA Genel Özellikleri (PubChem Open Chemistry Database, 2017)

Adipik Asit	
PubChem CID	196
CAS Kayıt Numarası	124-04-9
Ampirik Formül	C ₆ H ₁₀ O ₄
Moleküler Ağırlık	146.142 g/mol
2 Boyutlu Moleküler Yapı	
IUPAC Adı	Hekzandioik asit,
Bilinen Diğer İsimler	1,4-Butandikarboksilik asit 1,6-Hekzandioik Asit Adipinik Asit Adilactetten Acinetten
Fiziksel Tanımlama	Beyaz, Kokusuz Kristaller veya Kristal Toz.
Kaynama, Noktası	338 ° C
Erime Noktası	152 ° C
Yoğunluk	1.36 g/ml
Çözünürlük	Sıcak su, Metanol, Etanol ve Asetonda çözünür.
Günlük Alım Miktarı	0-5 mg/kg

1.4. Bitkisel Genetik Toksikite Testleri

Gıda katkı maddelerinin modern dünyada teknolojik bir zorunluluk haline gelmesi nedeniyle, olası genotoksik (Miloshev ve ark., 2014) kanserojenik ve mutajenik risklerinin incelenmesi oldukça önemli bir araştırma konusudur. Bu tür kimyasallara maruz kalan organizmalarda meydana gelebilecek genotoksik ve mutajenik etkiler, genetik materyalde tahribata neden olabilmektedir. Bu tahribat sonucu kanserojen etki meydana gelerek, bazı sağlık sorunları açığa çıkabilmekte ve bu hasar genetik materyal (DNA) yoluyla aktarılarak, organizmanın sonraki nesillerinde de etkisini gösterebilmektedir (Leme Morais ve Marin Morales, 2009).

Gıda güvenliği ve kalitesinin sağlanmasının yanı sıra DNA ile tepkimeye giren bileşiklerin etkilerinin bilinmesinin gerekliliği, ‘Genetik Toksikoloji’ bilim dalını önemli ve gerekli kılmaktadır. Bahsi geçen zararlı etkilerin araştırılması amacıyla günümüzde birçok güvenilir genotoksikite ve mutajenite test sistemi mevcuttur. Bu testler mikroorganizmalar, hayvanlar veya bitkiler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Ayrıca in vivo veya in vitro özellikte olabilmenin yanında hücre veya doku grupları üzerinde çalışmaya elverişlidirler.

Prokaryotlarla biyolojik tahliller, gen mutasyonunu ve primer DNA hasarını tetikleyen ajanların tespit edilmesini sağlarken, diğer yandan ökaryotlarla yapılan analizler, gen mutasyonlarından, kromozom hasarlarına ve anöploidilere kadar değişen daha büyük bir hasar derecesinin saptanmasını mümkün kılar.

Yüksek bitkiler, çevresel kirleticileri değerlendirebilecek mükemmel genetik modeller haline getiren ve genellikle izleme çalışmalarında kullanılan özellikleri sunar. Bununla birlikte, bu özellik yalnızca farklı ortamlardaki mutajenlere duyarlılığın yanı sıra, farklı organların ve dokuların hücrelerindeki nokta mutasyonundan, kromozomal aberasyonlara (KA) kadar çeşitli genetik bitiş noktalarını değerlendirme imkânı sağlamaktadır. Buna örnek olarak yapraklar, kökler ve polen gibi bitki organları gösterilebilir.

Genetik toksikoloji (genotoksikoloji) alanında pestisitler ksenobiyotikler, GKM’leri, gıda boyaları, sanayi atıkları, ağır metaller, nanopartiküller, bitki büyüme düzenleyicileri ve bitki ekstraktları gibi birçok ajanın etkilerinin incelenmesinde yüksek yapılı bitkilerin kullanılabilceğini birçok çalışmada ispatlamıştır. Bu yüksek yapılı bitkiler arasında en sık görülenler; *Allium cepa* (Türkoğlu, 2008), *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia* sp. (Santos ve ark., 2015), *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* ve *Hordeum vulgare*'dir (Grant, 1994).

Yüksek lisans tezimizde amacımız, öncelikle gıdalarda katkı maddesi (E355) olarak kullanılan fakat birçok alanda yaygın halde kullanımı bildirilmiş AA’in genotoksik ve sitotoksik etkilerinin bitkisel materyal üzerinde incelenmesidir.

Tezimizde bitkisel materyal olarak *Allium cepa* L. ve *Tradescantia pallida* H. seçilerek, toksikolojik test sistemleri olarak belirlenen “Kök Ucu Hücre Testi” ve “Stamen Tüyü Pembe Mutasyon Testi” ile AA’in farklı doz ve sürelerdeki uygulamaları gerçekleştirilmiştir. AA’in genotoksik ve sitotoksik etkileri, kromozomal aberasyon indeksi, mitotik indeks ve pembe mutasyonlu hücre oluşumu şeklinde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar kaydedilerek, istatistiksel analizi yapılmış ve yorumlanmıştır.

BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Çalışmalar

Gıda endüstrisinde birçok gıda katkı maddesi gıdaların renklendirilmesi, tatlandırılması ve korunması amacıyla kullanılmaktadır. Yiyecekler ile aldığımız bu maddelerin etkilerinin ve risklerinin değerlendirilmesi, toksikolojik olarak incelenmesi gıda güvenliği ve buna bağlı olarak insan sağlığı açısından çok önemlidir.

Bu etkilerin moleküler düzeyde incelenmek istendiği bir çalışmada, bir gıda aroması olan sinnamealdehit (CNMA) ve onun önemli metabolitlerinden olan sinnameik asitin (CA), insan serum albumin (HSA) üzerindeki etkileri Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (STD-NMR) ile incelenmiştir. Analiz sonuçları CNMA ve CA'nın her ikisinde de HAS'ya bağlandığını, CNMA ve CA'nın öncelikli olarak HSA'nın I ve II'inci bölgesi ile etkileşime girdiği belirlenmiştir (Sun ve ark., 2018).

Sentetik gıda aromaları ile ilgili bir çalışmada üzüm, erik ve portakal aromalarının akut toksisite etkisi kullanılarak incelenmiştir. *A. cepa* kök uçları, 24 ve 48 saat süre ile 3.5, 7.0 ve 14.0 mL/kg dozlar ile muamele edilirken, deney fareleri 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 ve 10.0 mL/kg dozlarda 7 gün boyunca oral yolla aroma vericiler ile beslenmiştir. 2.0, 5.0 ve 10.0 mL/kg dozla beslenen fareler 7. günde beslenmeden önce ölmüşlerdir. Bitki testi sonuçları, her üç aromasında hücre bölünmesini inhibe ettiğini ve belirgin sayıda mikronükleus ve mitotik iğ değişimini oluşturduğunu göstermiştir. Farelerin ötenazi edilerek incelenmesi sonucunda ise kemik iliği hücrelerinde mikronükleus oluşumunu önemli ölçüde indüklediği gözlenmiştir. Bu nedenle üzüm, erik ve portakal sentetik aroma vericileri önemli ölçüde sitotoksik, genotoksik ve mutajenik olarak değerlendirilmiştir (Sousa Sales ve ark., 2017).

Magnezyum stearat (MS), şekerleme, baharat, vitamin takviyesi ve farmasötik tabletler ile tozlarında sıklıkla kullanılmakta olan bir maddedir. AMES testi, *in vitro* kromozom sapması testi ve *in vivo* mikronükleus testi ile incelenmiştir. MS testte kullanılan beş bakteri suşunun herhangi birinde metabolik aktivasyonun varlığında ve yokluğunda pozitif bir cevap oluşturmamıştır. CHL/IU Çin hamster akciğer fibroblastlarında kromozom sapmalarında oluşturmazken, CD-1 farelerinin kemik iliğinde mikronükleus oluşumunu indüklediği gözlemlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak MS'nin genotoksik risk oluşturabileceği belirtilmiştir (Hobbs ve ark., 2017).

Allura Red AC (E129) uluslararası kabul görmüş bir gıda renklendiricisidir. 2013 yılında EFSA tarafından yapılan bir değerlendirmede genotoksistite endişeleri dile

getirilmiştir. Bu nedenle Allura Red AC'nin etkilerinin ortaya koyulacağı ayrıntılı bir çalışma yapılmak istenmiştir. Deney hayvanı olarak fare seçilmiştir. Genotoksik aktivite kemik iliği Mikronükleus Testi ve karaciğer, mide, kolon kullanılarak yapılan Comet Testi ile incelenmiştir (Bastaki ve ark., 2017).

Gıdaları renklendirmede kullanılan Azo boyalar [Tatrazin (E101), Sunset Yellow (E110), Karmozin (E124), Ponceau 4R (E124)] ile ilgili bir çalışmada, fermente süt ve bağırsak bakterileri izolatından elde edilen 120 adet laktik asit / probiyotik bakteri suşu kullanılarak, in vitro ve in vivo araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bakteri suşlarına azo boyalar 5-6 saat uygulandığında % 96-98 oranında biyolojik bozunuma uğradıkları gösterilmiştir. In vivo inceleme için 90 gün boyunca ratlara azo boya içeren diyet ürünler yedirilmiş, hematolojik, histopatolojik ve protein yapıları incelenerek değerlendirilmiştir. (Abulreesh ve ark., 2017).

Gıdalarda antioksidant özelliği nedeniyle kullanılan Bütilatlandırılmış Hidroksitoluen (BHT), kanser, astım ve çocuklarda davranış bozukluklarına neden olabilmektedir. İnsan kanı serumunda bulunan albumin, kana geçebilen küçük molekülleri ve ilaçları yapısına bağlama yeteneği göstermektedir. GKM doğrudan veya dolaylı olarak vücut proteinleri ile etkileşime girer. Albumine bağlanan GKM, konformasyonunda değişiklikler yaratarak ve hayati fonksiyonları etkileyebilmektedir. Yapılan bir çalışmada BHT'nin insanda serum albuminine bağlanması incelenerek farmokokinetik ve farmakodinamik profilinin belirlenmesi sağlanmıştır (Al-Shabib ve ark., 2017).

Sentetik gıda aromaları olan vanilya ve çarkıfelek meyvesi aroma vericileri, potansiyel antiproliferatif, sitotoksik ve genotoksik etkileri bakımından incelenmiştir. Aroma vericilerin sıvı formları satın alınarak, kök uçlarına 0.2, 0.4, 0.6 mL dozlar ve 24, 48 saat süre ile uygulanmıştır. Süre sonunda kök uçları hasat edilerek mikroskop altında incelenmiştir. Herbir doz için 5000 hücre sayılmıştır. Mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeksi hesaplanmıştır. İstatiksel analiz sonucunda 24, 48 saatlik uygulama periyotlarında uygulanan üç dozunda, doz ve süre artışına bağlı olarak hücre döngüsüne olumsuz etkilediği buna bağlı olarak mitotik indeksi düşürdüğü ve kromozomal aberasyon sayısını arttırdığı, ayrıca mitotik iğ tahribatı ve mikronükleus oluşuma neden olduğu belirlenmiştir (Nunes ve ark., 2017).

Toz halinde satılan yapay meyve sularının sitotoksik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada portakal ve guava (tropikal meyve) tozları incelenmiştir. Meyve suyu tozlarının 30 g/500 mL, 30 g/1000 mL olarak hazırlanan sulu çözeltileri 24 ve 48 saat süre ile soğan kök uçlarına uygulanmıştır. Elde edilen veriler

doğrultusunda portakal ve guava meyve suyu tozlarının genotoksik ve sitotoksik potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir (Peron ve ark., 2016).

Timol ve Karvakrol, *Origanum vulgare* bitkisinin eterik yağından elde edilen antimikrobiyal özellikli katkı maddeleridir. Bu maddeler gıda paketlemede yüksek dozlarda kullanıldıkları için toksikolojik riskleri bakımından incelenmek istenmiştir. Gıda paketlemede kullanılan eşdeğer dozdaki timol ve karvakrol in vitro mikronükleus (MN) testi ve fare lenfoma testi (MLA) ile incelenmiştir (Maisanaba ve ark., 2015).

Miloshev tarafından yapılan bir çalışmada, GKM olan Sodyum Nitrit, Kafein, İndigo Karmin, Eritrosin, Fast Green ve 4-aminoantipyrine (4-AAP) DNA hasarı oluşturabilme potansiyeli bakımından Comet analizi ile incelenmiştir (Miloshev ve ark., 2014).

Gıdalarda antioksidant olarak kullanılan, Sitrik Asit, Fosforik Asit ve kombinasyonları ile antimikrobiyal olarak kullanılan Benzoik Asit ve Kalsiyum Propiyonat'ın in vitro genotoksik etkileri insan lenfositlerinde incelenmiştir. Single Jel Elektrofrezisi kullanılarak meydana gelen DNA hasarları belirlenmiş ve test edilen dört GKM'si genotoksik olarak değerlendirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2014).

α -Heksilsinnamaldehit (HCA) ve p -Tert-bütil-alfa-metilhidrosinnamik aldehit (BMHCA) sahip olduğu karakteristik hoş çiçek kokusu nedeniyle ilaç ve gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Sotto tarafından yapılan bir çalışma ile, HCA ve BMHCA'nın oluşturabileceği genotoksik riskler Ames Testi ve Mikronükleus Testi ile incelenmiştir (Sotto ve ark., 2014).

Sodyum metasülfid gıda koruyucusu olarak kullanılmakta olan bir maddedir. Oluşturabileceği sitogenetik etkileri, *A. cepa* mitotik hücreleri üzerinde incelenmiştir. Çalışma sonunda, bütün uygulama gruplarında mitotik indeksin kontrole kıyasla anlamlı şekilde düştüğü, anormallikler de ise artışa neden olduğu görülmüştür (Rencüzoğulları, 2014).

Sentetik gıda renklendiricileri ve tatlandırıcılar ile yapılan bir çalışmada Brilliant blue, Carmoisine, Tatrazin, Trans-anethol, Vanilin ve Propilen glikol toksisitesi ratlar üzerinde incelenmiştir. Deney kimyasalları ratların diyet ürünlerine ayrı ayrı eklenerek verilmiştir. Sıçanların farklı vücut organları ve metabolik yolları üzerindeki en geniş toksik etkisi değerlendirilmek istenmiştir (Abd El-Wahab ve El-Deen Moram, 2012).

2.2. Adipik Asit ile İlgili Çalışmalar

Adipik Asit (AA)'in GKM olarak yaygınlaşmaya başlaması nedeniyle 1957 yılında yapılan çalışmada, diğer GKM olan Sitrik Asit ve Tartarik asit ile etkileri karşılaştırılmıştır. Akut Oral, Akut İntravenöz etkileri deney fareleri, Akut İntraperitoneal etkileri albino ratlar kullanılarak test edilmiştir. Deney sonunda, deneklere ötenezi uygulanarak ayrıntılı incelemeler gerçekleştirilmiştir. Akut oral etkiler; Mide ve ince bağırsak distansiyonu ve çekumun spastik konsantrasyonu (kasılma, iç içe geçme) şeklinde, Akut intravenöz etki; hemorajik akciğerler, Akut intraperitoneal etkiler; Hemorajik akciğerler ve bağırsak iritasyonu şeklinde gözlemlenmiştir (Horn ve ark., 1957).

AA metabolizmasının prosedürlerinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada C14 işaretli AA kullanılmıştır. Deney hayvanı olarak 150 – 250 gr ağırlığında erkek albino sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar 24 saat boyunca aç bırakılmışlar. Daha sonra gastrik gavaj yoluyla 2 – 4 ml suda bulunan 50 mg radyoaktif AA solüsyonu ile beslendi ve tekrar 24 saat boyunca aç bırakılmıştır. Sıçanlar, solunumdaki karbondioksitin belirlenebilmesi amacıyla, idrarın toplanması için ayrı ayrı metabolizma kafeslerine alınmıştır. İdrar numuneleri kurutularak fraksiyonlara ayrılmış ve bu fraksiyonlar analiz edildiğinde radyoaktif karbon dağılımı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada glikojende radyoaktif AA birikiminin incelenmesi amacıyla 100 mg radyoaktif adipik asitle beraber 400 mg su–glukoz çözeltisi gastrik gavaj yoluyla sıçanlara verilmiştir. İki saat sonra sıçanlar ötenezi edilerek, karaciğer diseksiyonu ile glikojen depoları incelenmiş ve radyoaktif işaretli karbonların bulunduğu belirlenmiştir (Monder ve ark., 1960).

Ekotoksikolojik bir çalışmada endüstri alanında yaygın olarak kullanılan 26 organik bileşiğin etkileri araştırılmıştır. Göl üstünden alınan su ile bütün bileşikler çözdürülmüştür. Deney hayvanı olarak “Koca Golyan Balığı” olarak bilinen Pimephales promelas seçilmiş ve deney süresi 1, 24, 72, 96 saat olarak belirlenmiştir. Suda bulunan AA'in ekotoksikolojik en düşük etki konsantrasyonu 96 saat için LC50 (Letal Consantration) 97mg/l olarak belirlenmiştir (ph <5.9). Deney sonuçlarında AA'in dozu ve uygulama süresinin artmasına bağlı olarak toksisitesinin artabileceği ortaya koyulmuştur. Deney düzeneğinde kullanılan suyun oksijen miktarı belirtilmediği ve bununda toksik olarak nasıl bir etki gösterebileceği bildirilmediği için bu araştırmanın; “AA toksiktir.” demek için yeterli olmadığı belirtilmiştir (Mattson ve ark., 1976).

Di(2-etilheksil) ftalat (DEHP), Di(2-etilheksil) adipat (DEHA) ve Ftalik Anhidrit % 1.2, % 2.5 ve % 1.5 konsantrasyonlar da diyet olarak uygulanarak, sıçan karaciğer ve böbrek DNA'sındaki 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG) seviyeleri incelenmiştir. Yalnızca diyetle

DEHP ve DEHA verilen sıçanların karaciğerinde (DEHP ve DEHA kanserojeninin hedef organı) 8-OH-dG düzeylerinde belirgin artışlar, gözlemlenmiştir. Sonuçlar, peroksizom proliferatörleri tarafından hepatokarsinogenezide, oksidatif DNA hasarının bulunduğunu göstermiştir (Takagi ve ark., 1990).

Drosophilla cinsiyet kromozomları üzerinde yapılan bir çalışmada AA' inde dahil olduğu 31 madde test edilmiştir. Kimyasal uygulamasından sonra cinsiyet kromozomları; olası yanlış eşleşmeler (nondisjunction), kromozom kayıpları, Y kromozomunda birleşme ve tranlokasyon oluşumu bakımından incelenmiştir. AA'in cinsiyet kromozomları üzerinde mutajenik bir etki göstermediği görülmüştür (Ramel ve Magbusson, 1979).

ABD 'de AA'inde içlerinde bulunduğu gıdalarda kullanımına izin verilen 498 adet madde mutajenik potansiyelleri açısından incelenmiştir. Toksikolojik test sistemleri olarak AMES Testi (*Salmonella typhimurium*) ve *Eshericha coli* WP2 Suşu Testi seçilmiştir. Deney sonuçları, negatif ve pozitif kontroller ile karşılaştırılarak yorumlanmıştır. AMES Testi'nde TA98, TA100, TA1535, TA1538 suşları kullanılmış ve her iki test sistemi S9 varlığı ve yokluğunda çalışılmıştır. Negatif ve pozitif kontrollerin işlevsel olduğunun bildirildiği bu çalışmada, AA'in 10 mg/plate konsantrasyonuna kadar mutajenik ya da sitotoksik olmadığı, fakat konsantrasyonun artışı ile beraber toksik özellik gösterebileceği sonucuna ulaşılmıştır (Priva ve ark., 1991).

Sıçanların radyoaktif AA ile beslenmesi sonucunda üre, glutamik asit, laktik asit, beta-ketoadipik asit, sitrik asit ve adipik asit olarak tanımlanan metabolik ürünler idrarda bulunmuştur, uygulama dozunun % 70'i CO₂ olarak vücuttan atılmıştır. Dokularda ise çok az radyoaktif AA dağılımı gözlenmiştir. AA'in, bakteri ve memeli hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Büyümeyi % 50 inhibe etmek için gerekli konsantrasyonlar, 45 mM (*E. coli*), 35 mM (*B. subtilis*) ve 25 mM (*HeLa*) olarak belirlenmiştir. İnsanlara günlük AA (7300 mg / gün'e kadar) verilmesinden sonra dozun % 37-75'ini idrarla atıldığı belirlenmiştir. ADI değerinin 0-5 mg/kg bw olduğu kaydedilmiştir. Uzun süreli olarak akciğerlere teneffüs edilmesi durumunda, AA tozu insanda üst solunum yollarını, karaciğer, böbrek ve deney hayvanlarında merkezi sinir sistemini etkilediği belirlenmiştir (Anonim, 1994).

QSAR (Quantitative Structure Activity-Nicel Yapı Aktivite İlişkisi), molekülün sahip olduğu kimyasal yapı ile bağlantılı olarak meydana getirdiği biyolojik aktivite, kimyasal reaktivite, toksisite ve fizikokimyasal parametreler gibi özelliklerinin nicel olarak belirtildiği bir yöntemdir. Kimyasal yapı ve parametreler sayılar ile ifade edilerek matematiksel bir korelasyon oluşturulur. Böylece bu korelasyonlar incelenerek birbirine benzer kimyasal

yapıya sahip ajanlar belirlenebilmelidir. Yapılan bir çalışmada aralarında AA'inde bulunduğu Alifatik Karboksilik Asitlerin (monokarboksilik asit ve dikarboksilik asitler), QSAR analizi yapılarak, toksisitesi bir siliyata türü olan *Tetrahymena pyriformis* 'te "Popülasyon Büyümesi Testi" kullanılarak incelenmiştir. Test sonuçlarında dikarboksilik asitlerin toksik olduğu, fakat monokarboksilik asitlerle karşılaştırıldığında hafif toksik olduğu değerlendirilmiştir (Seward ve Schultz, 1999).

Di(2-etilheksil) adipat (DEHA) östrojenik aktivitesi E-SCREEN testi kullanılarak araştırılmıştır. Geliştirilmiş bir test sistemi olan E-SCREEN için MCF-7 yerine, insan meme kanseri hücre hattı T47D kullanılmıştır. Test sonuçları zayıf östrojenik aktivite oluşumunu göstermiştir (Kawaguchi ve ark., 2002).

Literatürde karasal bitkiler üzerinde yapılan AA toksisitesi ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların birçoğu test prosedürlerine tam olarak uyularak yapılmamakla beraber, bulunan etki değerleri (EC₅₀)'ne göre AA karasal bitkiler üzerinde düşük toksik olarak değerlendirilmiştir.

Allelopatik bitkiler ile yapılan bir çalışmada pirinç (*Oryza sativa*) üretimi amacıyla çeltik fidelerinin yetiştirildiği ortamdaki, bileşikleri tanımlamak ve fitotoksisitelelerini değerlendirmek için kütle spektrometrisiyle birleştirilmiş gaz-kromatografi yöntemi ile çeltik sulu özütlerini analiz edilmiştir. Analiz sonucunda sulu özütte birçok organik asitle beraber AA'inde bulunduğu ortaya koyulmuştur. Herbir organik asitin özütü kontrol, 50, 100, 200, 400, 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ konsantrasyonlarında, 5 gün boyunca petrilerde bulunan *Astragalus sinicus* tohumlarına uygulandı. Her bir uygulama için 100 adet tohum kullanıldı. Daha sonra çimlenen tohumların fide büyüme hızları hesaplanarak, kontrol ile uygulama grupları karşılaştırıldı. Deney süresi sonunda elde edilen sonuçlar, AA konsantrasyonu arttıkça çimlenen tohumlardan elde edilen fidelerin boylarında azalma gözlemlendi. Kontrolle oranla (19.4mm±1.0.), en uzun fide 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de (112±3 mm) gözlemlenirken, en kısa fide boyu 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (26±1mm) uygulama dozunda görüldü. Doza artışına bağlı olarak AA'in çimlenme ve fide oluşumunu baskıladığı sonucu ortaya koyulmuştur (Matsui ve ark., 2001).

Petrol ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen AA üretimi, atmosfere sera gazı salınımını arttıran büyük bir faktördür. Yenilenebilir hammaddelerden AA üretiminin sağlanması, sürdürülebilir ve çevre dostu üretim sistemlerini geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Mevcut bir yöntemin bulunmaması nedeniyle araştırmacılar AA biyosentezi ile ilgili çalışmalar başlatmıştır. 2014 yılında yapılan bir çalışmada, asitoksodenyum - kompleks katalizli deoksihidrasyon (DODH) reaksiyonu ve ardından Pt/C-katalize edilmiş transfer

hidrojenasyon yoluyla mukik asidin, mukonik asit ve adipik aside dönüştürülmesi gerçekleştirilmiştir (Li ve ark., 2014). *Thermobifida fusca* B6 suşu kullanılarak AA biyosentezi ile ilgili yapılan bir çalışmada en yüksek verim ve titrasyona sahip biyolojik AA sentezi gerçekleştirilmiştir (Deng ve Mao, 2015).

Güncel bir çalışmada, *Penicillium chrysogenum*, *Clostridium acetobutylicum*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* gibi türler kullanılarak AA biyosentezinin mümkün olduğu ortaya koyulmuştur (Kruyer ve Peralta-Yahya, 2017). Diğer bir çalışmada AA'in glikozdan biyosentezi gerçekleştirilmiştir. Doymamış altı karbonlu dikarboksilik asitler olan 2-heksendioik asit ile mukonik asitin, enoat redüktaz (ERs) biyokatalizörlüğünde, AA'e enzimatik hidrojenasyonu sağlanmıştır (Joo ve ark., 2017).

2.3. *Allium cepa* L. ve *Tradescantia pallida* İle İlgili Çalışmalar

Duran, yaptığı çalışmada Türkiye'de ticari olarak satılan, toplumda insanların kolaylıkla ulaşabildiği ve gıdalara eklenebilen ticari formdaki, Monosodyum glutamat (MSG) ve Ribonükleotid [inosine 5'-monophosphate (IMP) ve Guanosine 5'-monophosphate (GMP)] 'in genotoksik potansiyelini incelemiştir. MSG, % 0.125, 0,25, 0.50 g/L, Ribonükleotid (I+G), % 0.20, 0.40, 0.80 g/L olacak şekilde distile suda çözdürülerek uygulama solüsyonları hazırlanmıştır. Solüsyonlar 24, 48, 72 saat süre ile soğanlara uygulanmıştır. Yapılan mitotik indeks incelemeleri, ticari olarak satılarak gıdalarda sıklıkla tüketilen, MSG ve I+G 'nin doza ve süreye bağlı olarak kontrole oranla mitotik indekste düşüşe neden olduğunu göstermiştir. Elde edilen sonuç MSG ve I+G 'nin genotoksik olabileceğini göstermiştir (Duran ve Akı, 2017).

Tavşancıl otu olarak da bilinen, *Heracleum sosnowskyi*, Avrupa ülkelerinde bulunan yabancı tip bir bitkidir. Yapılan bir araştırmada *H. sosnowskyi*'nin meyvelerinden elde edilen suyun genotoksik potansiyeli ve sitolojik aberasyon oluşturma etkisi incelenmiştir. *H. sosnowskyi*'den elde edilen meyve özütlerinin, 6 farklı (1, 5, 10, 50, 100 ve 300 mL/L) konsantrasyonda ki çözeltileri kök uçlarına uygulanmıştır. Mitotik aberasyonlar, kromozom aberasyonları ve mikronükleus oluşumu incelenmiştir. Elde edilen veriler *H. sosnowskyi* meyvesi özütlerinin aneugenik ve klastojenik aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir (Pesnya ve ark., 2017).

Etephon (ETF) ve Cyclanilide (CYC) modern tarımda kullanılan bitki büyüme düzenleyicileridir. Yapılan bir çalışmada ETF+CYC karışımının soğan kök ucu hücrelerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri incelenmiştir. 25, 50, 100 ppm'lik karışımlar 24, 48, 72 saat boyunca soğan köklerine uygulanmıştır. Deney süresi sonucunda test materyali

mikroskop altında incelendiğinde; C-mitoz, kromozom fragmentleri, poliploidi, binüklead hücre oluşumu, vagrant kromozom, anafaz ve telofazda köprü oluşumu, kromozom yapışkanlığı, gibi anormal hücre oluşumları ve kromozomal anormallikler gözlemlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlar ETF+CYC karışımının genotoksik ve sitotoksik etkileri indüklediğini göstermiştir (Yavuz-Kocaman ve Kılıç, 2017).

Gümüş nanopartikülleri (AgNP) bakterisidal özellikte olmaları nedeniyle tıbbi alanda ve gıda endüstrisinde ambalajlama esnasında sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada 2 ile 8 nm boyutları arasındaki AgNP'nin, sitolojik ve genotoksik etkileri ortaya koyulmak istenmiştir. Kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmalarda, AgNP'nin iki uygulamasında mitotik indekste azalışa ve kromozom sapma sayısında artışa neden olduğu belirlenmiştir (Becaro ve ark., 2017).

Brezilya elektrik ihtiyacının neredeyse tamamını hidroelektrik santrallerinden sağlamaktadır. Hidroelektrik santralleri bulunduğu bölgede ekolojik bozulmalara neden olabilmektedir. Yapılan bir çalışmada Brezilya'da bulunan nehirlerin sedimental maddesinin etkileri üzerine bir çalışma yapılmıştır. Sonuçlar tohum çimlenmesi ve mitotik indekste değişiklik görülmezken, kromozomal bozukluk ve nükleer anormalliklerde artış meydana geldiğini göstermiştir (Rambo ve ark., 2017).

Bangladeş' te yerel bir ipek boyama endüstrisinden, su kaynaklarına dökülen tekstil boya atıklarının genotoksik potansiyeli analiz edilmiştir. Soğan kökleri farklı konsantrasyonlara sahip çözeltilerde yetiştirilmiş ve çözeltilerde atık konsantrasyonu arttıkça kök büyüme inhibisyonunun arttığı makroskobik olarak gözlemlenmiştir. Kontrole göre çok düşük olmakla birlikte % 20'lik çözeltide bölünen hücreler tanımlanmış fakat % 60, % 80 ve % 100 gibi yüksek konsantrasyonlar da hücrelerde mitoz bölünme gerçekleşmediği belirlenmiştir. Boya atıklarının kromozomal anormallikleri indüklediği görülmüştür. Bunların sonucunda boya atık suyunun hücreler için toksik olduğu, insan sağlığını tehdit etmesi ve kansere neden olması açısından risk oluşturduğu belirlenmiştir (Rahman ve ark., 2017).

Tıbbi etkisi bulunan bitkilerin mutajenik ve toksik etkilerinin belirlenmesi önemli bir araştırma konusudur. Bu amaçla yapılan bir çalışmada tıbbi bitkiler olan *Xysmalabium undulatum* ve *Helichrysum caespitum* ekstraktlarının sitotoksik ve genotoksik etkileri incelenmiştir. *Xysmalabium undulatum* (0.125, 0.25, 0.50 mg/L) ve *Helichrysum caespitum* (0.00625, 0.0125, 0.025 mg /L) ekstraktlarına ait üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözelti soğan köklerine uygulanmıştır. Mikroskop incelemeleri sonucunda kromozomlarda yapışkanlık, C-Metafaz, anafaz ve telofazda köprü oluşumu, kromozom fragmentleri,

multipolar anafaz ve telofaz gibi kromozomal aberasyonlar gözlemlenmiş ve buna bağlı olarak bitkilere ait ekstraktların genotoksik etki gösterebileceği ortaya koyulmuştur (Okorie ve ark., 2017).

Sülfüramid yaprak kesen karıncalara karşı sıklıkla kullanılan insektisitlerdendir. 2009 yılında Sülfüramid kullanımına yasak getirilmesi nedeniyle, araştırmacılar aynı etkilere sahip metalik-insektisit arayışına girmiş, 5-phenanthroline ve 5-methyl-phenanthroline olarak bilinen iki formülünü geliştirilmiştir. Ticari olarak üretime ve satışa başlamadan önce, iki bileşenin genetik materyal üzerindeki etkileri *Allium cepa* L. ve *Tradescantia pallida* kromozomal aberasyon, mikronükleus testi, Trad-MN ve Trad-STM testi ile incelenmiştir. Her iki kimyasalında 0.5, 1 ve 2 mg/L konsantrasyonundaki çözeltileri soğan kök uçlarına uygulanmıştır. Sonuçlar da; 5-methyl-phenanthroline'in çimlenme oranlarına bakıldığında toksik etki göstermediği, mitotik indeks verilerinde 2 mg/L'lik uygulamada anlamlı bir sitotoksosite oluştuğu, 0.5 ve 1 mg/L uygulamada mikronükleus, anafazda köprü oluşumu gibi kromozomal aberasyonlar oluştuğu bildirilmiştir. 5-phenanthroline sonuçlarına bakıldığında sadece en yüksek konsantrasyon olan 2 mg/L'de genotoksik etkiler meydana getirdiği bildirilmiştir. Ayrıca *Tradescantia* üzerinde yapılan incelemelerde pembe mutasyon oluşumu gözlenmezken, mikronükleus oluşumunu kuvvetli şekilde indüklediği belirlenmiştir (Souza ve ark., 2017).

Forskolin, *Coleus forskohlii* (Kolyos)'dan izole edilen bir etken maddedir. Forskolin ($C_{22}H_{34}O_7$), birçok fizyolojik etkiye sahip olan ve bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan tıbbi önemi olan bir ajandır. Bu maddenin genotoksik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla *A. cepa* kullanılarak bir sitogenetik analiz yapılmıştır. Çalışma sonuçları, forskolinin mitotik indekste önemli azalmalar ile birlikte birçok kromozomal aberasyon oluşumunu indüklediğini göstermiştir (Mohammed ve ark., 2015).

Eugenia uniflora (Surinam kiraz ağacı), kan basıncını düşürücü, mide rahatlatıcı, bronşit, kolik ve karın ağrısını giderici olarak kullanılan şifalı bitkilerdendir. Yapılan bir çalışmada *A. cepa* testi kullanılarak *E. uniflora*'nın yaprak ve meyvelerinin antiproliferatif, mutajenik ve antimutajenik etkileri incelenmiştir (Kuhn ve ark., 2015).

Kentsel endüstriyel alanlarda, toprakta oluşan metal kirliliği yıllarca devamlılığını korur. Bu etkinin kanıtlanması amacıyla metalle kontamine toprakların yıllarca depolandığı, dolmuş alanlarında *Tradescantia* kullanılarak metal biyoakümülyasyonu ve mikronükleus testi kullanılarak genotoksitesisi bakımından incelenmek istenmiştir (Čėsniėnė ve ark., 2017).

İprodion, Karbaril, Dimetoat ve 4,4'-DDE tarım ve böcek ilacı olarak kullanılmakta olan kimyasallardır. Çevre ve canlılar üzerinde oluşturabilecekleri etkilerin belirlenmesi,

kullanılabilir etki dozların anlaşılması ve toprakta kalıntı bırakma risklerinin belirlenmesi amacıyla biyolojik indikatör olan *Tradescantia* (Trad-MN ve Trad-STM) kullanılarak incelenmiştir (Fadic ve ark., 2017).

Atmosferde oluşan kirlilik sağlık açısından büyük tehdit oluşturarak, birçok hastalığın oluşumuna neden olmaktadır. Hava kirliliğinin denetlenmesi amacıyla *Tradescantia* biyoindikatör olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Brezilya'da araçlar tarafından dışarıya bırakılan emisyon gazlarının, havada oluşturduğu kirliliğinin incelenmesi amacıyla bir çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmada değişik trafik yoğunluklarına sahip yolların yakınlıklarına *Tradescantia* fideleri ekilerek daha sonra incelemeler gerçekleştirilmiştir (Sposito ve ark., 2017).

Yapılan benzer bir çalışmada araç kirliliğinin, çevre sağlığı üzerindeki etkileri bakımından değerlendirilmesi yapılmıştır. Çevreden alınan numunelerde, partiküler made ve motor gazları bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle şehir merkezinden alınan numunelerin en yüksek miktarda Trad-MN oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir (Pereira ve ark., 2017).

Kentsel bahçe yetiştiriciliği, olumlu yönleri ile beraberinde bazı soru işaretleride oluşturmaktadır. Hava kirliliğinin bulunduğu alanlarda lokalize olan bahçelerde meydana gelen sebze yetiştiriciliği, üretilen gıdaların güvenli olup olmadığını düşündürmektedir. Bunun belirlenebilmesi amacıyla bahçelere ekilen *Tradescantia* fideleri kullanılmıştır. Bu şekilde trafik gazlarının birikimi incelenmiş ve element birikiminin, Trad-MN oluşumuna etkisi belirlenmiştir (Amato-Lourenco ve ark., 2017).

Şehir havasının kalitesinin ölçülmek istendiği bir diğer çalışmada, trafik kirliliğinin fazla olduğu alanlarda Trad-MN frekansında anlamlı bir artış olduğu belirlenmiştir (Costa ve ark., 2016)

Şehir içi otoyollardan gelen yağmur suyu akışı metaller, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), mineral yağ hidrokarbonları gibi pek çok kirlenici maddeyi içermektedir. Yapılan farklı bir çalışmada otoyoldan gelen yağmur sularının akışının gerçekleştiği, yağmur suyu giderlerinden alınan su ve tortu numunelerin genotoksitesisi incelenmiştir. Deney sonuçlarında alınan tortu numunelerinin Trad-MN oluşumunda artışa neden olduğu belirtilmiştir (Haile ve ark., 2016).

Seramik üretimi sırasında meydana çıkan endüstriyel gazlar ağır metaller gibi zararlı bileşikler içerebilmektedir. Yapılan bir çalışmada, atmosfere salınan endüstriyel emisyon gazlarının genotoksik potansiyelleri Trad-MN frekanslarına bakılarak incelenmiştir (Campos ve ark., 2016).

Çevresel tütün dumanının etkilerinin belirlenmesi için yapılan bir çalışmada, Sigara içilen açık alanlardaki hava kalitesinin belirlenmesi amacıyla, bir hastanenin bahçesinde sigara içilen alanlara gerçek zamanlı aerosol monitörü koyularak 10 gün boyunca izlenmiş ve ölçümler kaydedilmiştir. Bitkide birikimin incelenmesi için ise *Tradescantia* kullanılmıştır. Sonuçlar Al, Cd, Cu, Ni, Pb, Rb, Sb, Se ve V elementi birikimlerinin kontrole kıyasla sigara içilen bölgelerde daha yüksek konsantrasyon da olduğunu göstermiştir (da Silveira Fleck ve ark., 2016).

N –nitrosodiethylamine (NDEA), insanda tümör oluşumuna etki ettiği düşünülen *N*–nitrozo bileşiğidir. *Allium cepa* ve *Tradescantia pallida* kullanılarak genotoksik aktivitesi incelenmiştir. Kontrole göre mitotik indekste azalma görülürken, *T. pallida*’da mutajenik bir yanıt göstermemiştir (de Rainho ve ark., 2010).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Yüksek lisans tezimizin çalışma materyali olarak *Allium cepa* L. (soğan) ve *Tradescantia pallida* H. bitkileri seçilmiştir. Test materyali olan arpacık soğanı (kalık) Erdoğan Ekinci Ltd. Şti 'nden satın alınmıştır. *T. pallida* ise bölümümüzde yetiştirilen anaç bitkiden çelikleme yöntemi ile çoğaltılarak elde edilmiştir.

3.1.1.1 *Allium cepa* L. Genel Özellikleri

Alliaceae familyasına ait olan *Allium cepa* L. büyük boyutlu ve az sayıda ($2n=16$) kromozomlara sahiptir. Kirleticilere karşı hassasiyet göstermesi nedeniyle mikroskopik olarak rahat bir gözlem sağlamak ve bu sayede mitotik döngü ve kromozomlarda meydana gelecek hasar ve sapmaların belirlenmesi için mükemmel bir deney materyali oluşturmaktadır. *A. cepa* farklı varyeteleri kromozom karyotiplemesine ait görseller Şekil 3.1. de gösterilmektedir.



Figure-7
Karyotype in *Allium cepa* L., 8M+6Sm+2St in Nasik variety



Figure-8
Karyotype in *Allium cepa* L., 8M+6Sm+2St in White variety



Figure-9
Karyotype in *Allium cepa* L., 8M+6Sm+2St in Kashmiri variety

Şekil 3.1. *Allium cepa* L. varyetelerine ait karyotip görüntüleri (Ramesh, 2015)

Bir test sistemi olarak *A. cepa*'nın kullanımı Levan tarafından başlatılmıştır. Kromozom özellikleri tanımlanarak ve kolşisin uygulaması sonrası oluşan mitotik iğ

anormallikleri ortaya koyulmuştur (Levan, 1938). Daha sonra, aynı yazar tarafından organik tuzların farklı solüsyonlarının *A. cepa*'nın meristematik kök hücrelerinde birkaç kromozomal aberasyon türüne neden olduğu gösterilmiştir (Levan, 1945).

Levan'ın ortaya koyduğu çalışmaların ışığında, Fiskeşjö, *A. cepa* test prosedürün de standartlaşmaya gitmek istemiş, test basamaklarının tek tek irdelendiği bir çalışmaya ortaya koyulmuştur. Yapılan bu çalışmanın sonucunda, test kimyasalının farklı konsantrasyonu ile yapılan uygulamalarda, kök büyümesine bakılarak etki konsantrasyonunun (Effective Consantration - EC), basit ve kolay bir yöntemle belirlenmesinin mümkün olduğu belirtilmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında *A. cepa* testinin diğer genotoksik testlerle anlamlı bir korelasyon içerisinde olduğu belirlenmiştir (Fiskeşjö, 1985). Bu da *A. cepa* kök ucu hücre testinin kimyasalların genotoksik/sitotoksik potansiyellerinin incelenmesinde güvenilir ve geçerliliği saptanmış bir test sistemi olduğunu göstermektedir.

3.1.1.2. *Tradescantia pallida* H. Genel Özellikleri

Anavatanı Güney Amerika olan bu bitki, Commelinaceae familyasına aittir. Türk toplumda “Mor Telgraf Çiçeği” olarak bilinmektedir ($2n=18$). Bilinen 71 *Tradescantia* türü vardır. Diğer ülkelerde çiçeklerinin örümceğe benzetilmesi nedeniyle “*spidewort*, *spider lily*, *cradle lily*” olarak bilinmektedir.



Şekil 3.2. Çiçeklenme mevsimine ait *Tradescantia pallida* görüntüsü (Özgün fotoğraf)

Yaz aylarında çiçeklenme gösterirken, diğer aylarda sadece yaprak oluşturmaktadır. Sabah saatlerinde açan pembe-mor renkli çiçekleri üç taç yapraklıdır ve çok kısa ömürlüdür, öğlen saatlerinden itibaren kapanıp solmaya başladıkları görülür (Şekil 3.2.). Tropikal ve yarı tropikal bölgelerde yayılım gösterir ve çok yıllık bitkilerdir.

Genellikle mor kalp şeklindeki yapraklarının güzelliği açısından dekoratif amaçla kullanılmaktadır. Susuzluğa, soğuğa karşı dirençlidir, don yaşadıktan sonra bile tekrar yeşerdikleri bilinmektedir. En iyi gelişimi 10 - 15°C arasındaki sıcaklıklarda göstermektedir. En güzel mor renkte yaprakların elde edilebilmesi için bitki direkt güneşten korunmalıdır, aksi halde yaprak renkleri yeşile dönmektedir. *Tradescantia*, genellikle çelikleme yöntemiyle çoğaltılır ve bu işlemin uygulanacağı en uygun zaman Nisan ve Mayıs aylarıdır (T. C. Milli Eğitim Bakanlığı, 2011) fakat tohumdanda bitki elde edilmektedir (Şekil 3.3.).

Tradescantia bitkisine ait polen hücreleri, mayozun erken tetrad safhasında fiziksel (radyasyon, hava kirliliği v.b.) ve kimyasal (ilaç, pestisit v.b.) mutajenlere karşı hassasiyet göstermektedir. Bu evrede mutajenle teması sonucunda kromozom sapmaları meydana gelmektedir. Oluşan asentrik kromozom fragmentleri ve yapışkan kromozom uçları bir araya gelerek mikronükleus oluşturma eğilimindedir. Bu hassasiyetin meydana getirdiği tetrad ve mikronükleus birlikteliği, *Tradescantia* Mikronükleus testinin (Trad-MN) toksikolojik bir test sistemi olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur (Ma, 1981).



Şekil 3.3. *Tradescantia pallida*. Genel bitki görüntüsü (Özgün fotoğraf)

3.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanma Prosedürleri

3.2.1. Adipik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması

Adipik Asit sıcak suda çözünebilmektedir. Bu nedenle deney stok çözeltisi sıcak saf su kullanılarak elde edilmiştir. Stok çözelti 150 mg/L olacak şekilde hazırlanmış, daha sonra mikropipet ile seyreltme yöntemiyle uygulama çözeltileri hazırlanmıştır.

3.2.2. Farmer Fiksativi Hazırlanması

Hazırlanışında 3:1 oranı kullanılmaktadır. 3 kısım Etil Alkol (% 96) : 1 kısım Asetik Asit eklenerek hazırlanmaktadır.

3.2.3. 1N HCL Asit Hazırlanması

Cam pipet kullanılarak % 37'lik HCL'den 8,28 ml alınıp, saf su ile 100 ml ye tamamlanmasıyla elde edilir.

3.2.4. Karminik Asit (Asetokarmin) Hazırlanması

200 ml için;

90 ml Asetik Asit 110 ml H₂O ile seyreltilir. Elde edilen 200 ml'lik bu çözelti içerisine 2 g karmin eklenir. Manyetik karıştırıcıda orta dereceli bir ısıda kaynaması engellenerek, kapağı sıkıca kapatılmış bir şekilde iyice çözünmesi sağlanır. Bu işlem 4-5 gün tekrarlanarak, işlem sonunda elde edile boya çözeltisi filtre kağıdı ile süzülür. Boya partiküllerinden arındırılan boya çözeltisi buzdolabında +4°C de buzdolabında saklanır.

3.3. Yöntem

3.3.1. Kök Büyümesi İnhibisyon Testi ve EC₅₀ Değerinin Hesaplanması

Kök büyümesi İnhibisyon Testi (KBİT), uygulanacak kimyasal ajanın, kök uçlarının büyümesi üzerine etkilerinin makroskobik olarak gözlemlenmesini sağlamaktadır. Ayrıca köklerin milimetrik ölçümlerinin yapılarak etki değerlerinin ortaya koyulması ve böylelikle genotoksik ve sitotoksik etkilerin belirlenmesi amacıyla kullanılacak EC₅₀ değerinin saptanmasına olanak vermektedir.

Soğanlar seçilirken taze görümlü, benzer boyutta ve sağlam olmalarına dikkat edilmiştir. Soğanların deney tüpündeki sıvıya direkt temasının sağlanması amacıyla soğanlara zarar vermeden kabukları soyulmuştur (Şekil 3.3.1.).

KBİT için, AA'in dozları rastgele belirlenmiştir. Bu dozlar; 3.125 mg/L, 6.25 mg/L, 6.75 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L, 37.5 mg/L, 50 mg/L, 62.5 mg/L, 75 mg/L, 87.5 mg/L, 100

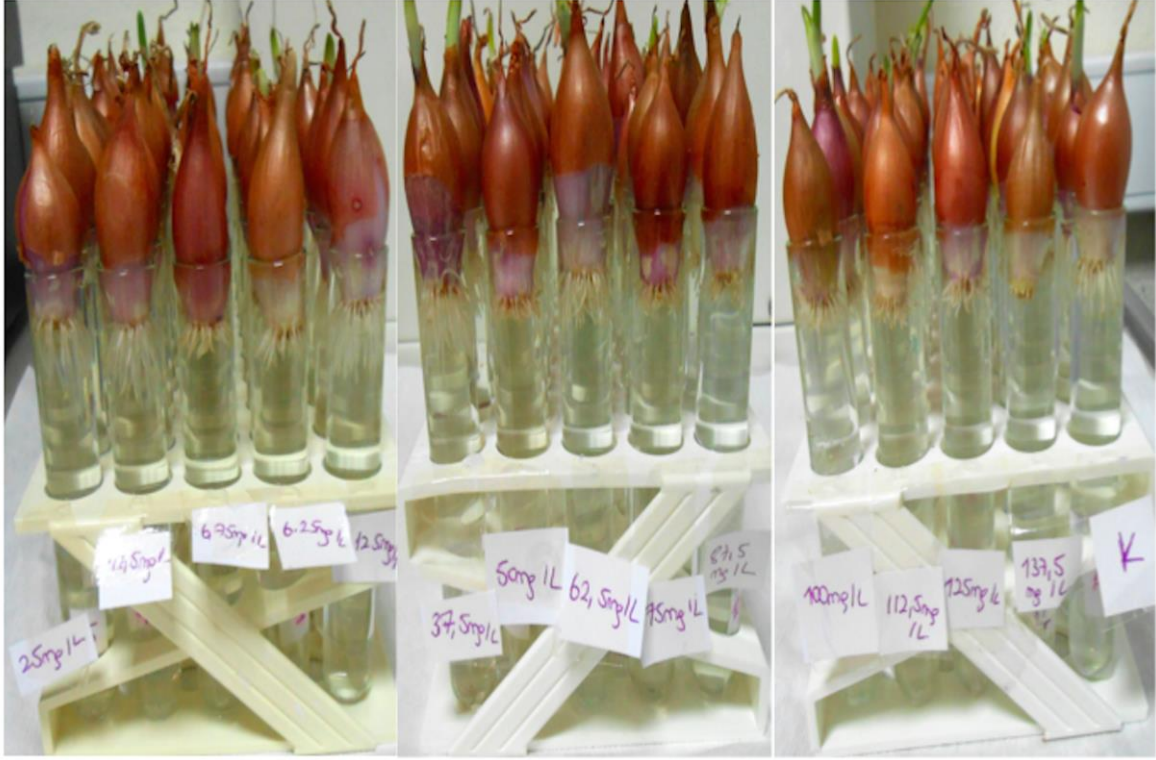
mg/L, 112.5 mg/L, 125 mg/L ve 137,5 mg/L olacak şekilde saf sudaki çözeltilerden meydana gelmektedir. Kontrol grubu için saf su ve belirlenen 14 farklı konsantrasyondaki çözelti, soğanlara direkt olarak uygulanmıştır. Her bir grup 10 tekrar şeklinde düzenlenmiştir (Şekil 3.3.2.).

Uygulama süresi 96 saat olarak belirlenmiştir. Deney sonuna kadar tüplerdeki sıvı seviyeleri her gün kontrol edilerek azalma var ise uygun çözelti ile tamamlanmıştır. Süre sonunda çimlenen soğanlar incelenerek çimlenmeyen sağlıklı soğanlar elenmiş ve her gruptan 5 adet çimlenmiş soğan seçilmiştir. Kök uçları hızlı bir şekilde hasat edilerek, her bir soğan örneğinde en uzun 5 kök seçilmiş, uzunlukları milimetrik cetvel yardımıyla kaydedilmiştir. Her bir uygulama grubu için 25 adet kök ölçümü (5 soğan x 5 kök) gerçekleştirilerek, ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Kök uzunlukları incelendiğinde; çimlenen köklerin uzunluğu, kontrol grubunun yarısı kadar olan uygulama çözeltisi konsantrasyonu EC_{50} (37,5 mg/L) değeri olarak belirlenmiştir. Deneylede kullanılacak uygulama konsantrasyonları $EC_{50/2}$ (18,75 mg), EC_{50} (37,5 mg/L), $EC_{50 \times 2}$ (75 mg/L) olacak şekilde belirlenmiştir.



Şekil 3.3.1. Seçilen soğan örnekleri



Şekil 3.3.2. KBİT uygulaması ve EC₅₀ belirlenmesi: Çimlenmiş soğan görüntüleri

3.3.2. *Allium cepa* Çimlendirilmesi ve Adipik Asit (AA) Uygulaması

AA saf sudaki çözeltileri; 18.75 mg/L, 37.5 mg/L ve 75 mg/L olarak 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. *Allium cepa* testi için uygulama periyotları 24, 48 ve 72 saat olacak şekilde belirlenmiş ve deney serileri her biri 5 tekrarlı olacak şekilde hazırlanmıştır. Toplam 60 adet soğan kullanılmıştır.

Uygulama başlatılmadan önce, soğanlar saf su içeren deney tüplerine yerleştirilerek karanlık ve sıcaklığı 25-30°C olan laboratuvar ortamında 3-4 gün süre ile çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenen kökler 4-5 cm uzunluğa geldikten sonra tüplerdeki saf sular boşaltılmış ve yerine hazırlanan çözeltiler koyularak, uygulama periyodu başlatılmıştır. 24, 48 ve 72 saatlik deney süreleri sonunda soğan kök uçları tek tek hasat edilerek, Farmer Fiksatif bulunan şişelerin içine alınmıştır ve +4°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir. 24 saat fiksatifte bekletilen kök uçları daha sonra % 96'lık etil alkol içerisine alınarak mikroskopik incelemeler için saklanmıştır.

Uygulamalar başlatılırken ve sonlandırılırken sabah saatleri tercih edilmiştir. Bunun nedeni soğan köklerindeki mitotik aktivitenin sabah 07.00-08.30 saatlerinde en yüksek seviyeye ulaşmasıdır.

3.4. *Allium cepa* L. Mitotik Aktivite ve Kromozom İncelemesi

Çalışmamızda “Asetokarmin Ezme Preparat Yöntemi” bazı değişiklikler ile birlikte uygulanmıştır (Tsuchiya ve Nakamura, 1979).

A. cepa kök uçlarının mikroskopik preparat haline getirilebilmesi ve sorunsuz olarak incelenebilmesi çeşitli işlem basamaklarının uygulanmasını gerekli kılmaktadır. Bu uygulama basamakları; Fiksasyon, Maserasyon ve Boyamadır.

3.4.1. Fiksasyon

Bu basamak canlı haldeki bitki dokusunda ani ölüm meydana getirilerek, hücrelerin canlı haline en yakın şekilde sabitlenmesini (fikse edilmesini) amaçlamaktadır. Çalışmamızda deney süresi sonunda hasat edilen kök uçları, Farmer Fiksatif bulunan şişeler içerisine alınarak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 24 saat fiksatifte bekletilen kök uçları daha sonra % 96'lık etil alkol içerisine alınarak +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.4.2. Maserasyon

Bitki hücreleri köşeli yapıdadır ve birbirlerine orta lamel vasıtasıyla bağlanarak muntazam şekilde sıralanmıştır. Maserasyon, orta lamelin yumuşatılması ile birbirine bağlanan bitki hücrelerinin, lam üzerinde tek tek ayrılarak gözlenebilmesine olanak sağlamaktadır. Çalışmamızda maserasyon işlemi, 60°C'ye ayarlanan su banyosunda, kök uçlarının 1N HCl asit bulunduran deney tüplerinde alınarak, 8 dakika bekletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda kök uçları saf su içerisine alınarak asitten arındırılmıştır.

3.4.3. Boyama ve Preparat Hazırlanması

Saf su içerisinden alınan kök uçları, fazla suyu havlu kağıda emdirilerek daha sonra asetokarmin bulunan falkon tüplere aktarılmıştır. Buzdolabında +4°C'de 48 saat bekletilerek iyice boyanmaları sağlanmıştır.

Yeterli boyanmaya ulaşan kök uçları lam üzerine alınmıştır. Köklerin, en uçta daha koyu boyanmış şekilde görülen, mitotik aktiviteye sahip meristematik doku kısımları 2-3 mm kesilmiştir. Kökün kurummasının engellenmesi için üzerine boya damlatılarak, lamel ile kapatılmıştır. Filtre kağıdı kullanılarak lam ve lamel arasındaki hava kabarcıkları ve fazla boya alınmıştır. Kök ucu hafifçe ezilerek hücrelerin tek tabaka halinde dizilmesi sağlanmıştır.

3.4.4. Mikroskopik Analizler

Hazırlanan mitotik preparatlar, Motic BA210 marka-model ışık mikroskobunda 1000X büyütme de görüntülenmiştir. Her uygulama için 5 preparat hazırlanarak, herbir preparatta 1000 hücre sayımı gerçekleştirilmiştir. Toplam 5000 hücre sayılarak, mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeksi hesaplanmıştır.

Görüntülenen mitotik hücrelerde, safhalara ve aberasyonlara ait örnekler entellan ile kapatılarak, daimi preparat haline getirilmiş ve Zeiss AX10 Scope A1 marka-model mikroskopta, Zeiss AX10 Cam 503 Color marka-model kamera ile fotoğraflandırılmıştır.

3.4.5. Mitotik Aktivite ve Kromozomal Aberasyon (KA) İndeksinin Hesaplanması

Mitotik indeks (MI), Sitotoksisitenin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir parametredir. Hesaplanması ise mitoz bölünme geçiren hücre sayısının, toplam hücre, sayısına bölünerek 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır. Bu hesaplama aşağıda gösterilmiştir (Akı ve Çördük, 2011);

$$\text{Mitotik İndeks} = \frac{\text{Bölünen Hücre Sayısı}}{\text{Görüntülenen Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.1.)$$

Kromozomal aberasyon indeksi (KAI) ise genotoksisite belirteçidir. Hesaplanması, KA görülen hücre sayısının, toplam hücre sayısına bölünerek, 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır. Bu hesaplama aşağıda gösterilmiştir (Çördük ve ark., 2015);

$$\text{Kromozomal Aberasyon İndeksi} = \frac{\text{KA Hücre Sayısı}}{\text{Görüntülenen Toplam Hücre Sayısı}} \times 100 \quad (3.2.)$$

3.4.6. İstatiksel Analiz

Gerçekleştirilen *A. cepa* Kök Ucu Hücre Testinde, mitotik indeks ve kromozomal aberasyon indeksi sonuçlarının, kontrole göre anlamlılığı Z Testi kullanılarak belirlenmiştir.

3.5. *Tradescantia pallida* H. Çoğaltılması ve Adipik Asit (AA) Uygulaması

T. pallida bitkisi Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Biyoloji bölümünden bulunan anaç bitkiden, Nisan ayında elde edilen çelikler sayesinde çoğaltılmıştır. Alınan çelikler 3:1 oranında Torf : Perlit karışımı bulunan saksılara dikilmiştir. Dikim sonrası bitkiler sulanarak, saksılar bölümümüzde bulunan bitki yetiştirme odasına alınmıştır. Ortam fotoperiyot 16/8 ve sıcaklık 22°C olacak şekilde optimize edilmiştir. Üç ay süre ile çeliklerin gelişmesi beklenmiştir. Ergin hale gelen bitkiler, bitki yetiştirme odasından alınarak laboratuvar ortamında sabah akşam güneşini güzel alabileceği cam kenarına koyulmuştur.

Bitki çiçeklenmeye başladığında, ön deneme olarak AA aşağıdaki iki yöntem ile uygulanmıştır;

- Toprak sulama suyu olarak ve çiçeklere püskürtülerek
- Bitki kesilerek AA çözeltisine koyularak ve çiçeklere püskürtülerek

Ön deneme sonucunda alınan çiçek örnekleri incelendiğinde; AA'ın bitki sulama suyu olarak uygulandığında az etkili olduğu görülmüştür. Daha etkili olması nedeniyle deneyin bitkilerin AA çözeltisinde bekletilmesi yöntemi ile yapılmasına karar verilmiştir.

3.5.1. *Tradescantia pallida* Stamen Tüyü Mutasyon Analizi

Stamen tüyü mutasyon analizi için taze tomurcuk bulunduran dallar seçilerek kesilmiş ve içerisinde saf su bulunan beherlerde 24 saat süre ile bekletilmiştir. Süre sonunda sabah beherdeki saf sular boşaltılarak yerine 18.75 mg/L, 37.5 mg/L ve 75 mg/L konsantrasyonlarında AA çözeltisi koyulmuştur. Pozitif Kontrol olarak ise *T. pallida* üzerindeki etkisi çalışılmış olan bir fungusit Dodin (0,16 ml/L) kullanılmıştır (Çördük ve ark., 2015).

Deney süreleri 24, 48, ve 72 saat olarak belirlenmiştir. Her periyodun sonunda çiçek örnekleri canlı haldeyken incelemeler gerçekleştirilmiştir. Çiçekler sabah erken saatte açmakta ve öğleye doğru kapanıp solmaktadır. Bu nedenle inceleme işlemleri sabah 08.00-09.00 saatleri arasında yapılmıştır

Her uygulama dozu için 5-10 adet çiçek incelenmiştir. Çiçekler lam üzerine alınarak, gliserol ve su (1:1) karışımı damlatılmıştır. Daha sonra Olympus SZ51 marka-model stereo mikroskop altında diseksiyon iğnesi kullanılarak stamen tüyleri tek tek ayrılarak sıralanmıştır. Bu sayede stamenlerin görüntülenmesi ve mutasyonların belirlenmesi kolaylaştırılmıştır. Belirlenen pembe mutasyonlu hücreler sayılarak fotoğraflandırılmıştır (Şekil 4.22., Şekil 4.23.).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Kök Büyümesi İnhibisyon Testi (KBİT) Bulguları

KBİT, toksisitesi incelenecek ajanların etkilerinin makroskobik olarak gözlenebilmesi ve EC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. EC₅₀, kök uçlarındaki büyümeyi kontrole göre % 50 oranında azaltan kimyasal konsantrasyonunu ifade etmektedir.

KBİT için, AA'in dozları 3.125 mg/L, 6.25 mg/L, 6.75 mg/L, 12.5 mg/L, 25 mg/L, 37.5 mg/L, 50 mg/L, 62.5 mg/L, 75 mg/L, 87.5 mg/L, 100 mg/L, 112.5 mg/L, 125 mg/L ve 137,5 mg/L olacak şekilde rastgele belirlenmiştir. Bu dozlar; ayrı ayrı şişelere alınmış, üzerine saf su eklenerek çözeltiler hazırlanmıştır.

EC₅₀ değeri belirlenebilmesi için, uygulama süresi 96 saat olarak belirlenmiştir. Her grubtan 5 adet çimlenmiş soğan ve her soğan için en uzun olanlardan 5 adet kök seçilmiştir (5 soğan x 5 kök= 25 kök her bir doz için). Kök uzunlukları milimetrik cetvel yardımıyla ölçülmüştür. AA'in *Allium cepa* kök uzunluğu üzerine etkisinin belirlenmesi için, her bir doz için ölçülen kök uzunluğu ortalaması Çizelge 4.2.'te verilmiştir (Çizelge 4.2. Kontrol *, EC₅₀ Değeri ** ile gösterilmiştir.).

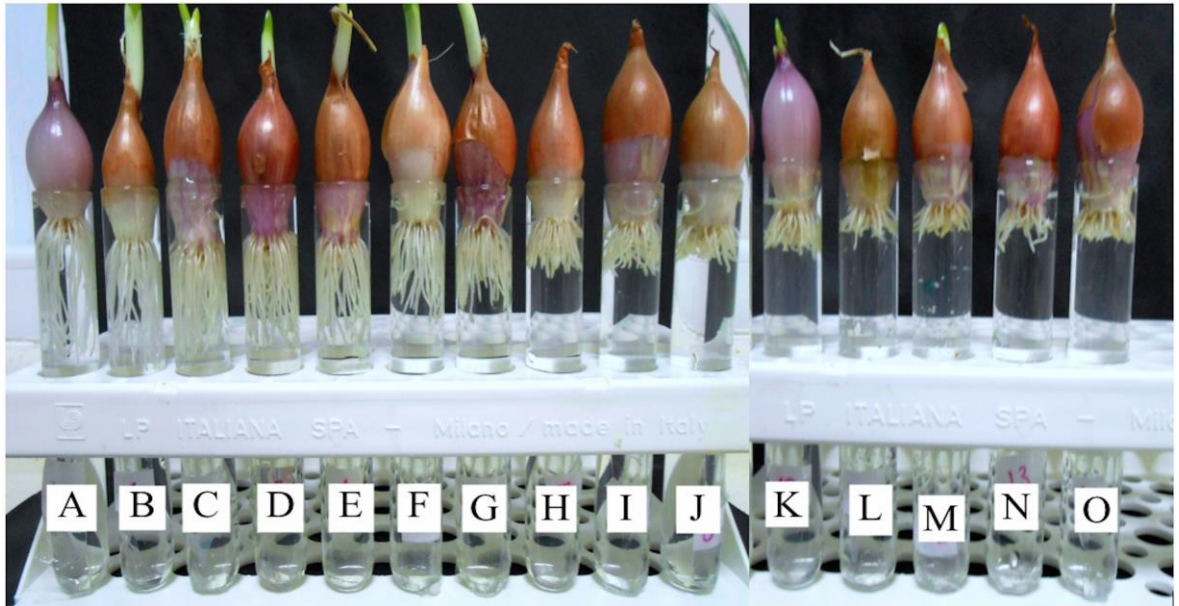
Kök uzunlukları incelendiğinde; çimlenen köklerin uzunluğu, kontrol grubunun yarısı kadar olan uygulama çözeltisi konsantrasyonu EC₅₀ (37,5 mg/L) değeri olarak belirlenmiştir. Deneylede kullanılacak uygulama konsantrasyonları EC_{50/2} (18,75 mg), EC₅₀ (37,5 mg/L), EC_{50x2} (75 mg/L) olacak şekilde belirlenmiştir. AA için belirlenen bu değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Adipik Asit (AA) için belirlenen EC₅₀ değerleri.

Adipik Asit	Değerler
EC _{50/2}	18,75 mg/L
EC ₅₀	37,5 mg/L
EC _{50x2}	75 mg/L

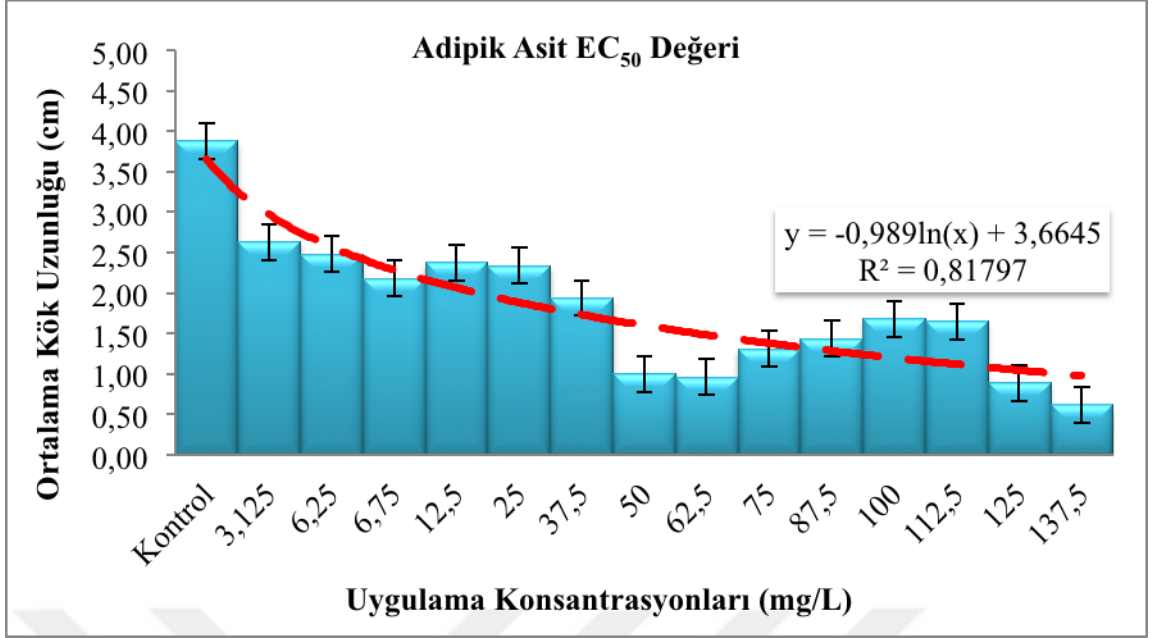
Çizelge 4.2. KBİT sonunda ölçülen kök uzunlukları

Test Maddesi	Konsantrasyon (mg/L)	Ortalama kök uzunluğu (cm) ±SS
Negatif Kontrol (H ₂ O)	Saf Su	3,88±0,39 *
Adipik Asit (AA)	3,125	2,63±0,33
	6,25	2,48±0,33
	6,75	2,18±0,28
	12,5	2,38±0,42
	25	2,34±0,27
	37,5	1,94±0,23 **
	50	1,00±0,18
	62,5	0,96±0,29
	75	1,31±0,42
	87,5	1,44±0,41
	100	1,68±0,64
	112,5	1,65±1,07
	125	0,89±0,33
137,5	0,62±0,21	



Şekil 4.1.AA çözeltilerinin *Allium cepa* kök büyümesi üzerine etkisi.

A: Kontrol, B: 3.125 mg/L, C: 6.25 mg/L, D: 6.75 mg/L, E: 12.5 mg/L, F: 25 mg/L, G: 37.5 mg/L, H: 50 mg/L, I: 62.5 mg/L, J: 75 mg/L, K: 87.5 mg/L, L: 100 mg/L, M: 112.5 mg/L, N: 125 mg/L, O: 137,5 mg/L



Şekil 4.2. *Allium cepa* KBİT sonucu ölçülen kök uzunlukları (EC₅₀ : 37,5 mg/L)

4.2. Mitotik İndeks Bulguları

Üç farklı konsantrasyondaki [EC_{50/2} (18,75 mg/L), EC₅₀ (37,5 mg/L), EC_{50x2} (75 mg/L)] AA çözeltileri 24, 48 ve 72 saat süre ile *Allium cepa* köklerine uygulanarak mitotik indeks verileri kaydedilmiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. AA uygulaması sonucu mitotik indeks verileri.

Uygulama Süresi	Konsantrasyon	Mitotik İndeks
24 Saat	Kontrol	9,12±0,39
	18,75 mg/L (EC _{50/2})	5,59±0,31
	37,5 mg/L (EC ₅₀)	5,17±0,31
	75 mg/L (EC ₅₀ *2)	4,23±0,27
48 Saat	Kontrol	9,09±0,39
	18,75 mg/l (EC _{50/2})	4,10±0,27
	37,5 mg/l (EC ₅₀)	3,58±0,26
	75 mg/l (EC ₅₀ *2)	3,11±0,24
72 Saat	Kontrol	9,20±0,39
	18,75 mg/l (EC _{50/2})	4,20±0,28
	37,5 mg/l (EC ₅₀)	3,33±0,25
	75 mg/l (EC ₅₀ *2)	2,63±0,22

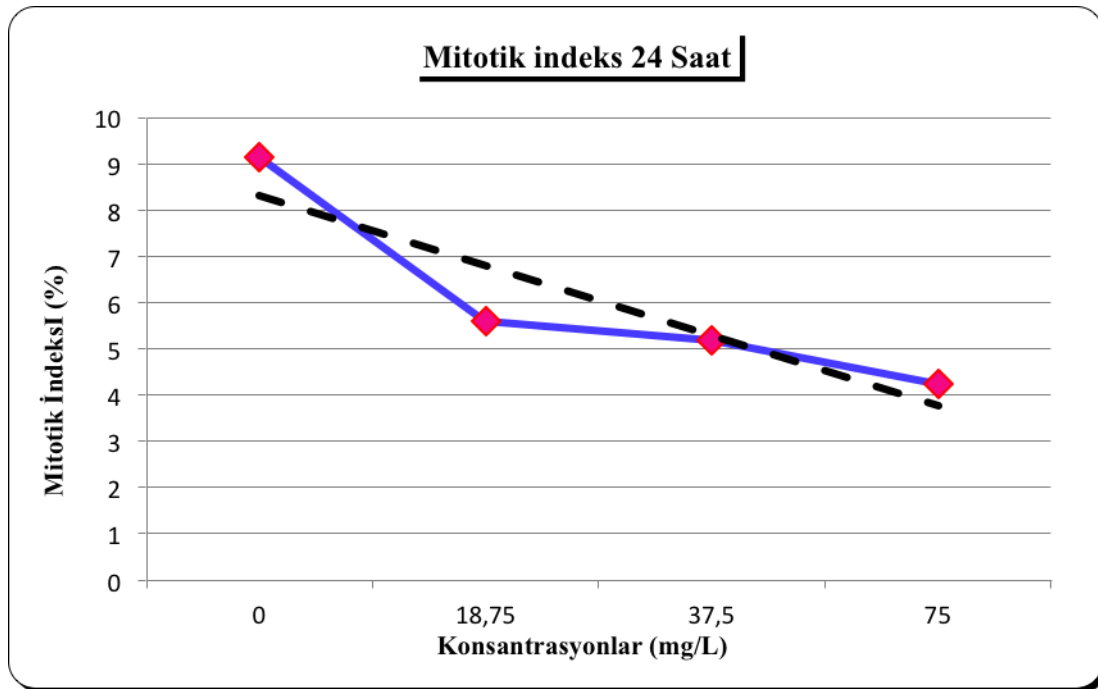
Çizelge 4.3.'deki veriler incelendiğinde, AA konsantrasyonu ve maruz bırakılma süresi artışına bağlı olarak, mitotik indekste anlamlı bir değişim meydana getirdiği belirlenmiştir. Tüm sonuçlar kontrol ile ve uygulama grupları birbiri arasında karşılaştırıldığında belirgin değişiklikler gözlenmiştir.

Mitotik indeks üzerindeki değişimin yüzdelik olarak ifadesi Çizelge 4.4.'de belirtilmiştir. Ayrıca tüm uygulamaların mitotik indeks üzerindeki etkileri, grafikler halinde gösterilmiştir (Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6.).

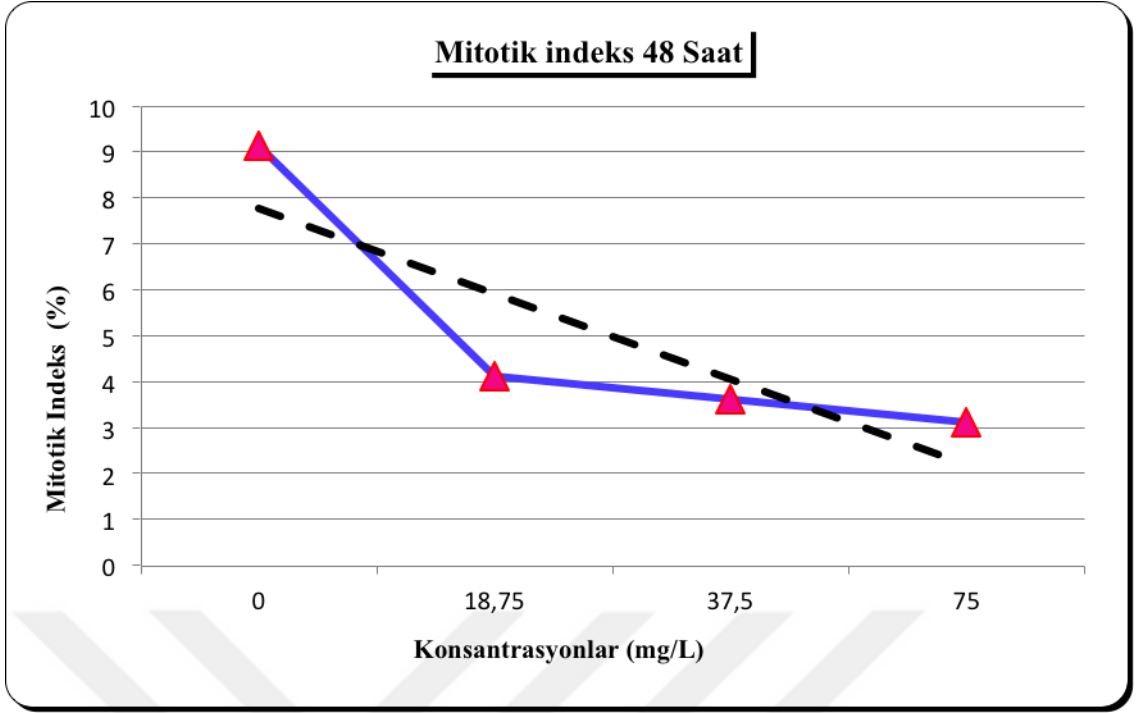
Çizelge 4.4. AA'in mitotik indeks üzerindeki etkisinin yüzdelik gösterimi

Uygulama Dozları (mg/L)	Uygulama Süresi		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
18,75	% 38,71	% 55,05	% 53,95
37,5	% 43,32	% 60,75	% 63,49
75	% 54,13	% 66	% 71,17

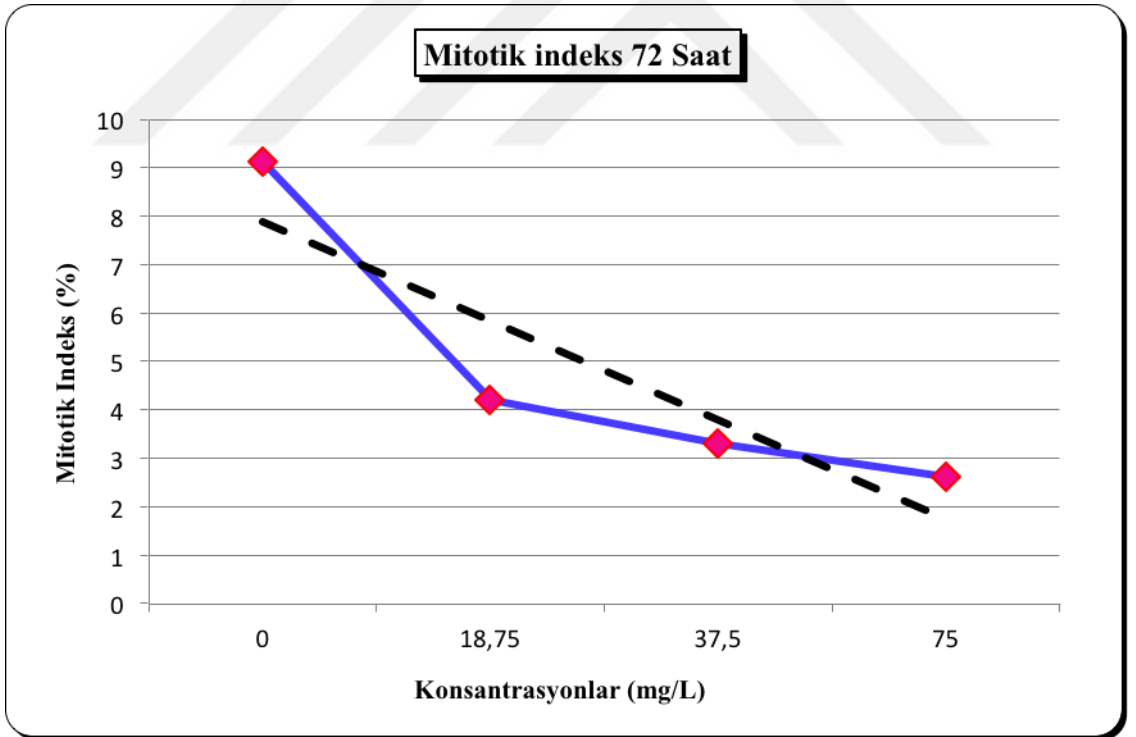
Mitotik indeks yüzdelik oranları incelendiğinde (Çizelge 4.4.), kontrole göre AA mitotik indeks üzerinde en az inhibe edici etkiyi % 38,71 ile 24 saat 18,25 mg/L'lik uygulama da gösterirken, en yüksek oranda inhibe eden doz ise 72 saat süre ile uygulanan 75 mg/L'lik deney gurubudur ve mitotik aktivite % 71,17 olarak belirlenmiştir.



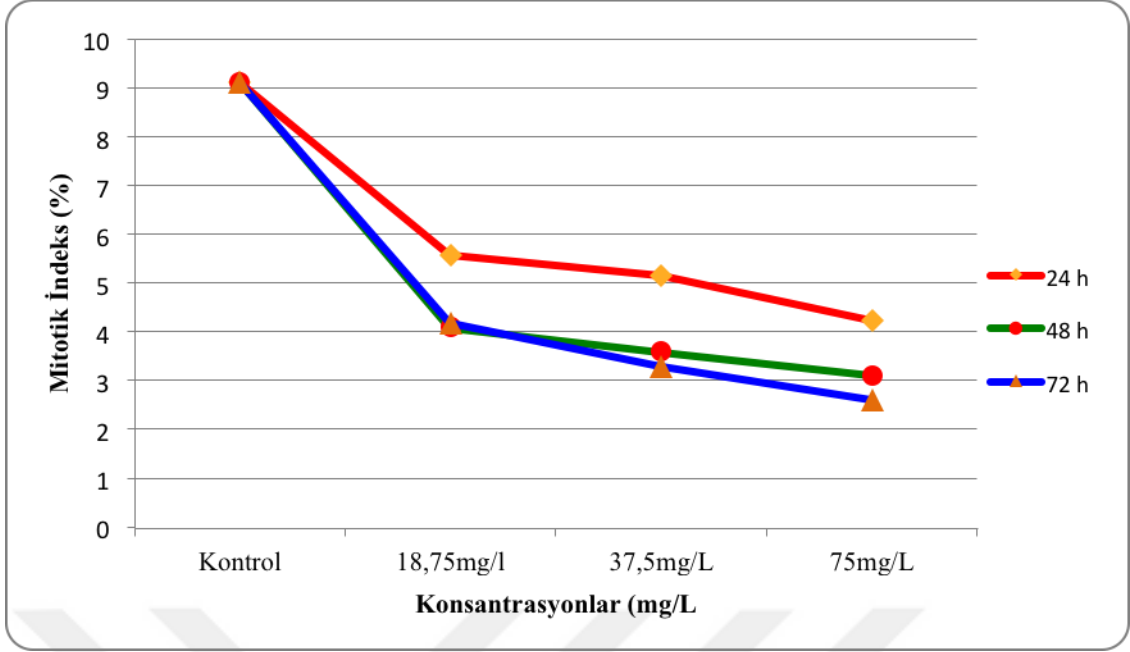
Şekil 4.3. 24 Saatlik AA uygulaması sonrası mitotik indeks değişimi



Şekil 4.4. 48 Saatlik AA uygulaması sonrası mitotik indeks değişimi



Şekil 4.5. 72 Saatlik AA uygulaması sonrası mitotik indeks değişimi



Şekil 4.6. 24,48 ve 72 Saatlik AA uygulaması sonrası mitotik indeks değışimi

Çizelge 4.5. Adipik Asit uygulaması, Z İstatistiği anlamlılık düzeyleri

Uygulama süresi	Doz (mg/L)	Sayılan Toplam Hücre Sayısı	Bölünen Hücre Sayısı	Mitotik İndeks	$\alpha = 0,05$	$\alpha = 0,001$
24 Saat	Kontrol	5271	481	9,12±0,39		
	18,75	5341	299	5,59±0,31	*	
	37,5	5062	262	5,17±0,31	*	*
	75	5243	222	4,23±0,27	*	*
48 Saat	Kontrol	5271	481	9,09±0,39		
	18,75	5065	208	4,10±0,27	*	*
	37,5	5107	183	3,58±0,26	*	*
	75	5171	161	3,11±0,24	*	*
72 Saat	Kontrol	5271	481	9,20±0,39		
	18,75	5085	214	4,20±0,28	*	*
	37,5	5070	169	3,33±0,25	*	*
	75	5126	135	2,63±0,22	*	*

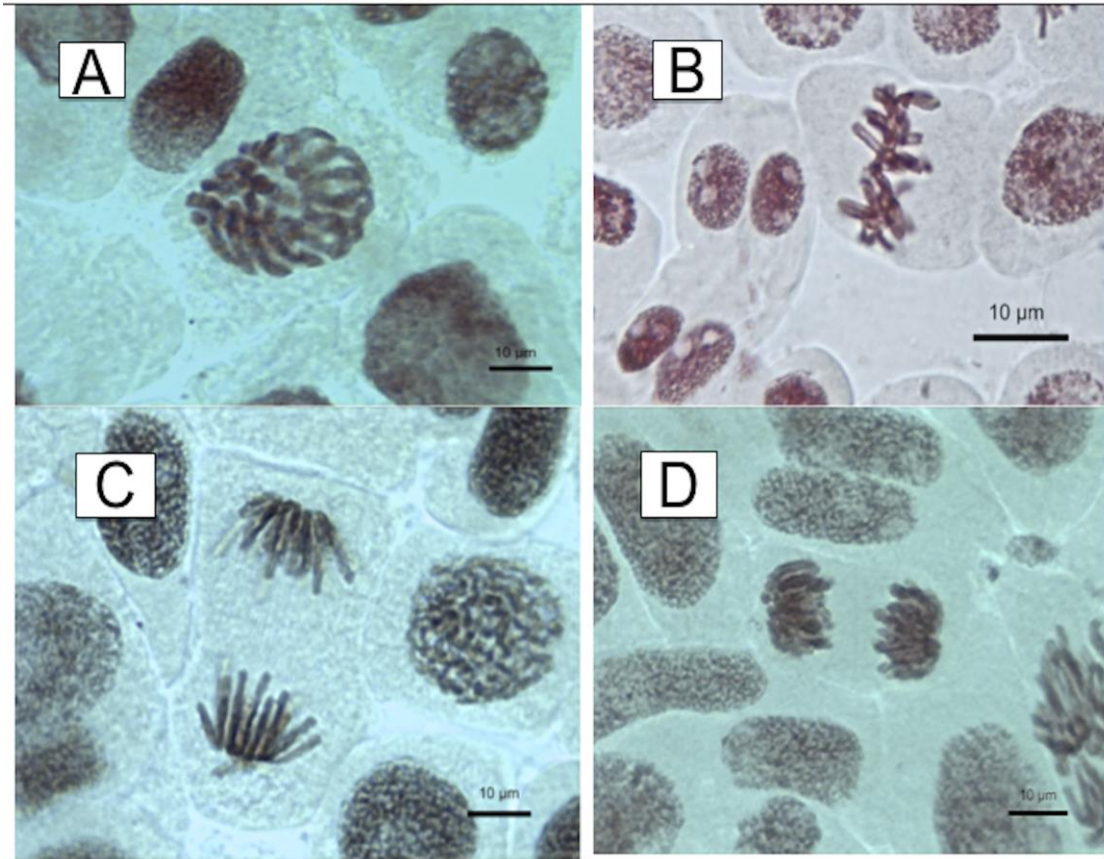
* İstatiksel olarak anlamlılık düzeyini ifade etmektedir.

Mitotik indeks istatistiksel verileri incelendiğinde, kontrole kıyasla bütün uygulama süresi ve dozlar da anlamlı değişimler gözlenmiştir. Z İstatistiği anlamlılık düzeyleri, $\alpha=0,05$ için 1,96 ve üzeri, $\alpha=0,001$ için 3,27 ve üzeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. (Çizelge 4.4.)

4.3. Kromozomal Aberasyonlar

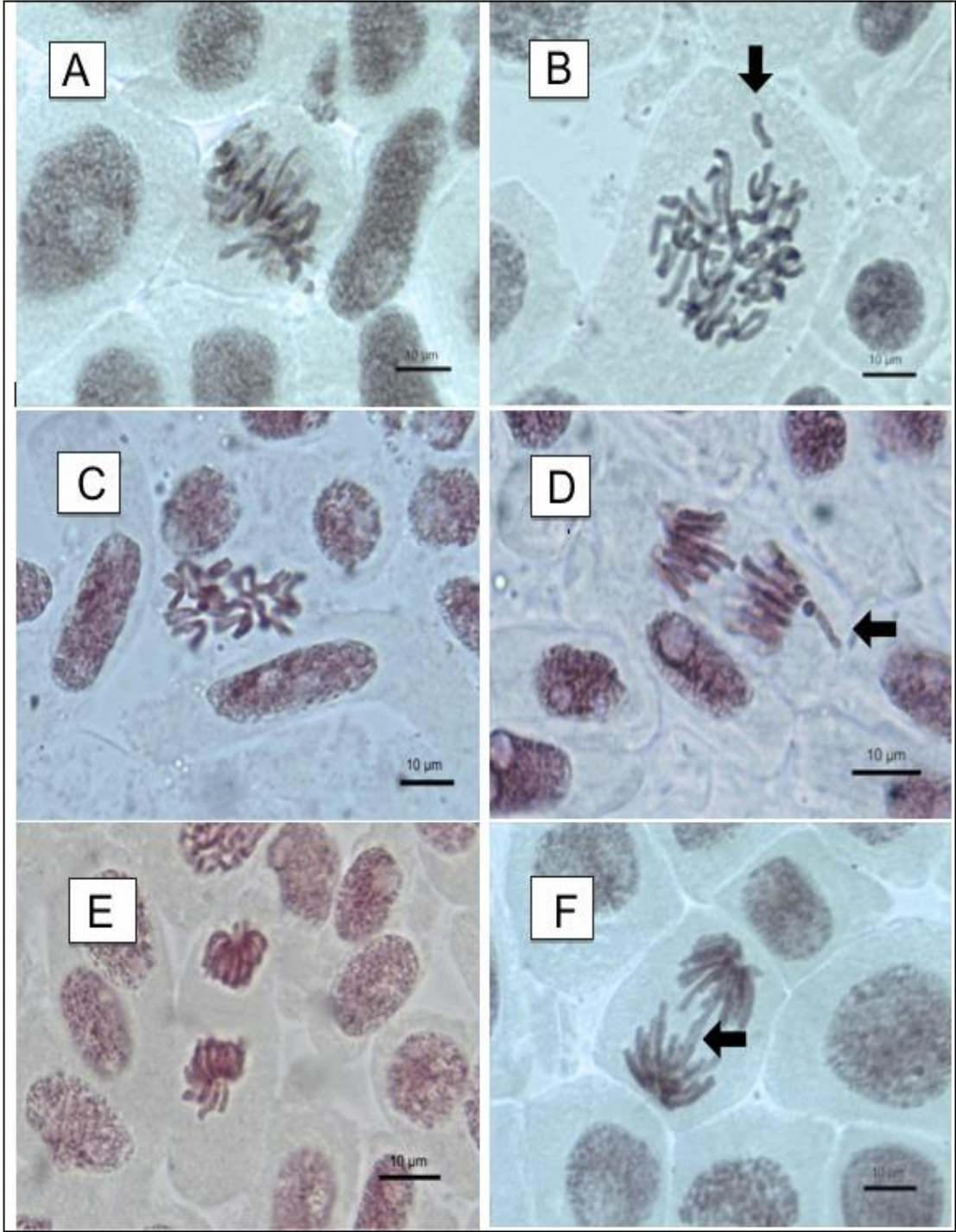
4.3.1. Kromozomal Aberasyonlara Ait Görseller

Uygulama ve kontrol gruplarına ait kök uçları preparasyon ile 1000X büyütmede incelenmiştir. Normal ve anormal hücreler belirlenerek fotoğrallandırılmıştır. Yalnızca saf su uygulanan, kontrol grubundaki, kök uçlarında görüntülenen normal haldeki mitoz evreleri Şekil 4.7.'da verilmiştir.

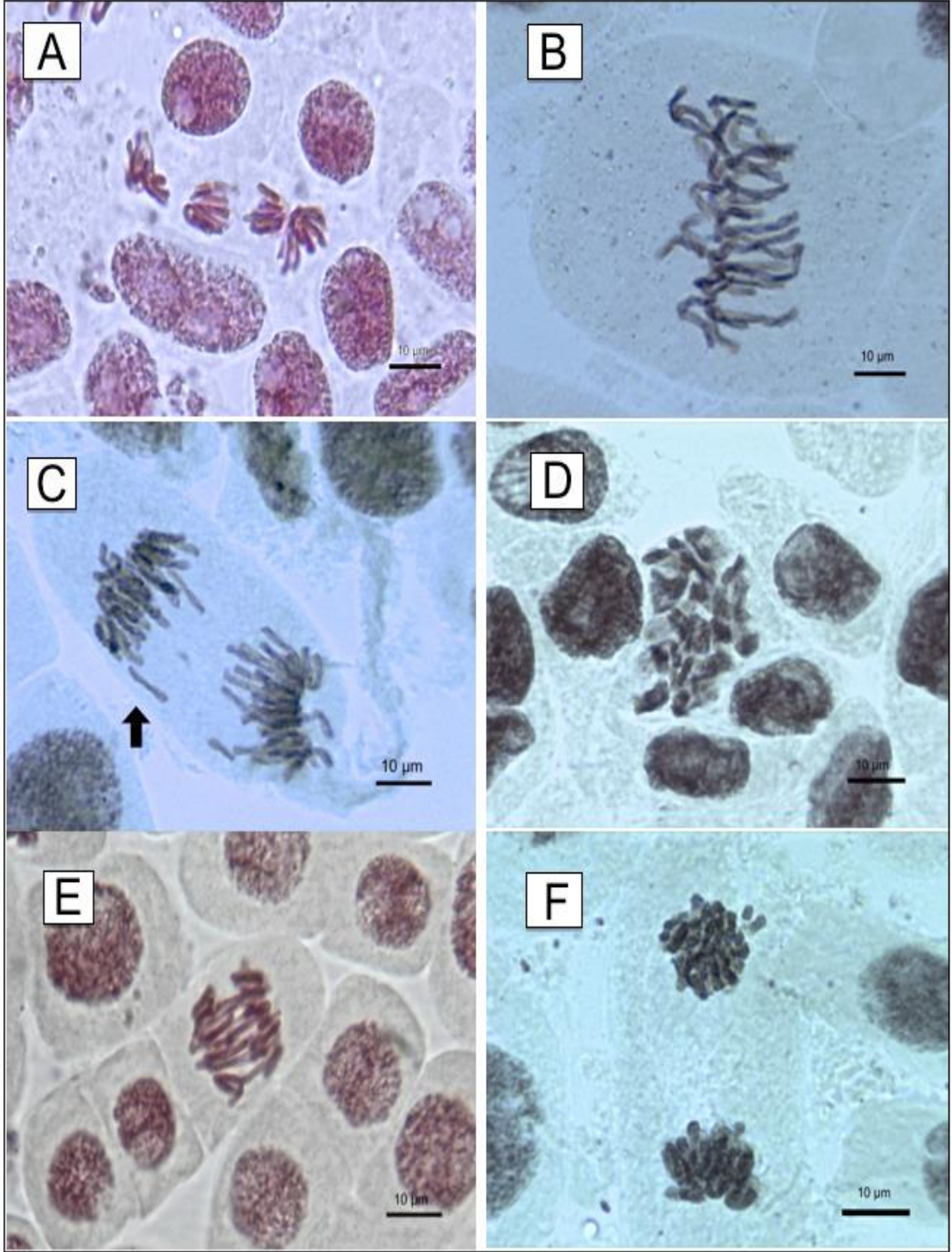


Şekil 4.7. Kontrol A: Profaz, B: Metafaz, C: Anafaz, D: Telofaz.

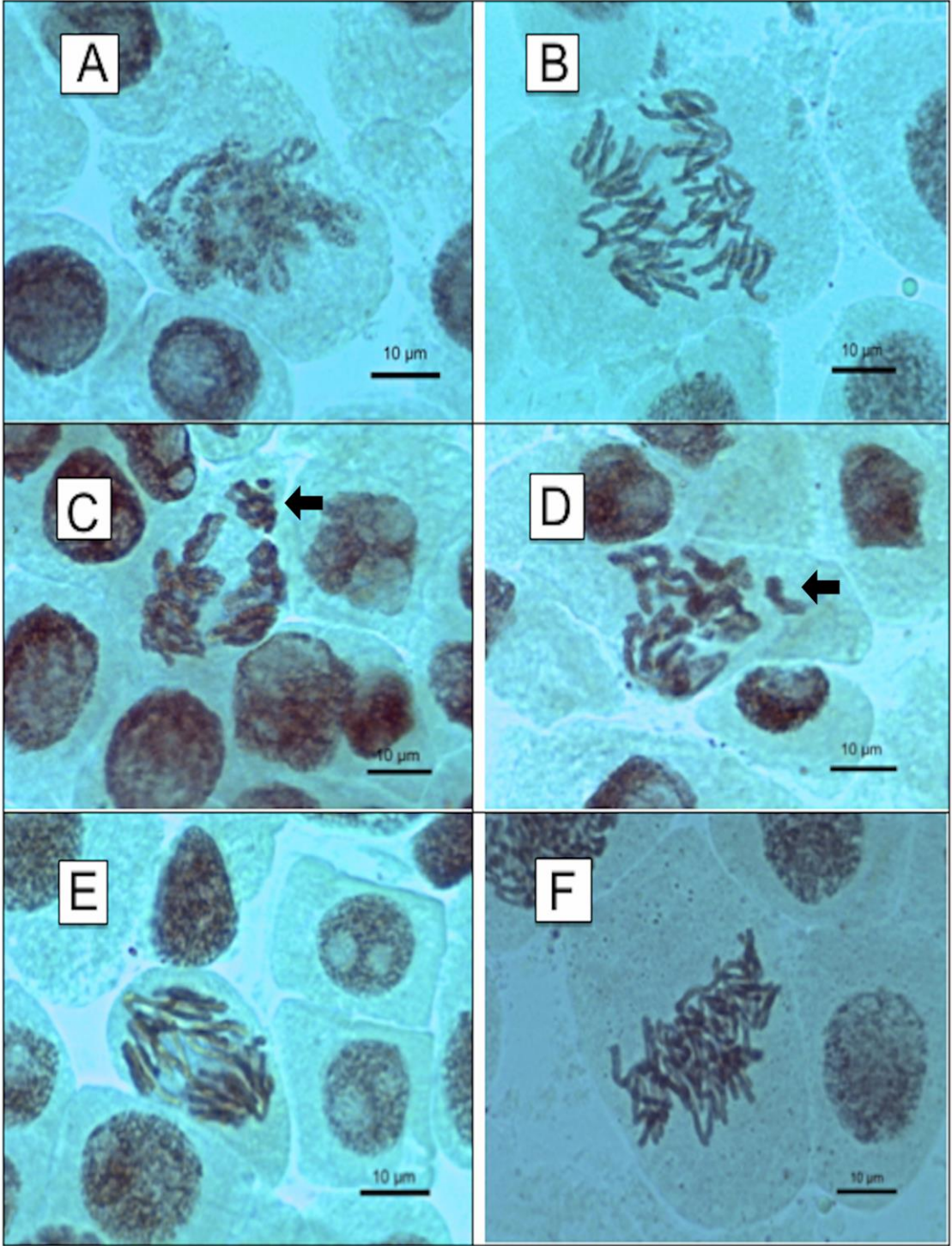
AA uygulamaların da fotoğraflanan mitotik evrelere ait kromozomal aberasyon örnekleri; Şekil 4.8., Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.



Şekil 4.8. AA 24 Saat 37,5 mg/L uygulaması A: Metafazda ploidi ve plak kayması, B: Vagrant kromozom, C: C-Mitoz, D: Lagard kromozom, E: Telofazda yapışkanlık, F: Anafazda köprü oluşumu



Şekil 4.9. AA 48 saat 37,5 mg/L uygulaması A: Anafazda tripolar oluşumu ve deformite, B: Metafazda eş ayrılmama, C: Vagrant kromozom, D: Kontraksiyon E: Anafazda köprü oluşumu ve yapışkanlık, F: Star kromozom



Şekil 4.10. AA 72 saat 37,5 mg/L uygulaması A: Spiral çözünme, B: Anafazda köprü oluşumu ve deformasyonu, C: Düzensiz telofaz ve kromozom kopması, D: Düzensiz anafaz, E: Anafazda köprü oluşumu, F: Ploidi

4.3.2. Kromozomal Aberasyon Bulguları

24, 48 ve 72 saatlik AA uygulamalarının, *A. cepa* üzerinde oluşturduğu kromozomal aberasyon sayısı belirlenmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırılarak ilgili verilerin ortalama ve standart sapmaları belirlenmiş, istatistiksel veriler ile birlikte çizelgede gösterilmiştir. Tüm uygulamalarda, Z İstatistiği anlamlılık düzeyleri, $\alpha=0,05$ için 1,96 ve üzeri, $\alpha=0,001$ için 3,27 ve üzeri anlamlı olarak kabul edilmiş ve elde edilen tüm verilerin anlamlılık gösterdiği görülmüştür.

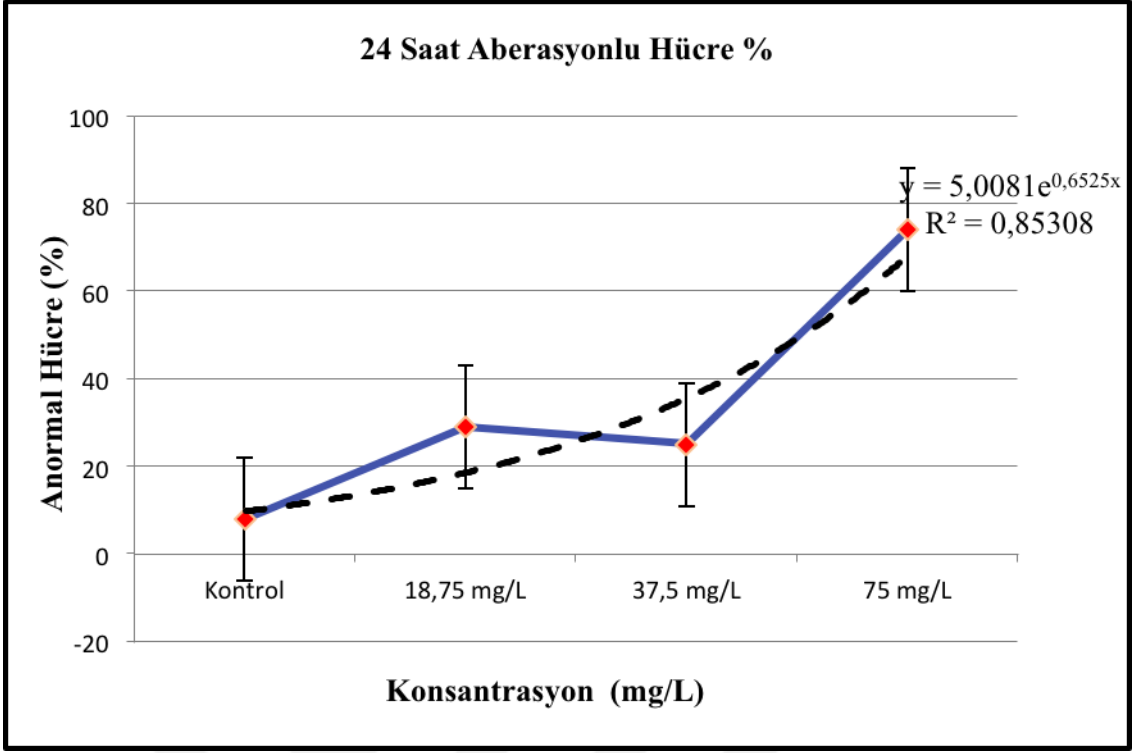
Çizelge 4.6. AA uygulamalarının, kontrol grubuna göre anlamlılık düzeyleri

Maruz Kalma Süresi	Doz (mg/L)	Anormal Hücre Sayısı	Sayılan Toplam Hücre Sayısı	% (Kromozomal Anormallik)	$\alpha=0,05$	$\alpha=0,001$
24 saat	Kontrol	8	481	$1,66 \pm 0,58$	-	-
	18,75	29	299	$9,7 \pm 1,71$	*	*
	37,5	25	262	$9,54 \pm 1,81$	*	*
	75	74	222	$33 \pm 4,71$	*	*
48 saat	Kontrol	6	481	$1,66 \pm 0,42$		
	18,75	34	208	$16 \pm 2,56$	*	*
	37,5	55	183	$30 \pm 3,38$	*	*
	75	49	161	$30 \pm 3,62$	*	*
72 Saat	Kontrol	5	481	$1,03 \pm 0,46$		
	18,75	105	214	$49 \pm 3,41$	*	*
	37,5	86	169	$50 \pm 3,84$	*	*
	75	81	135	$60 \pm 1,07$	*	*

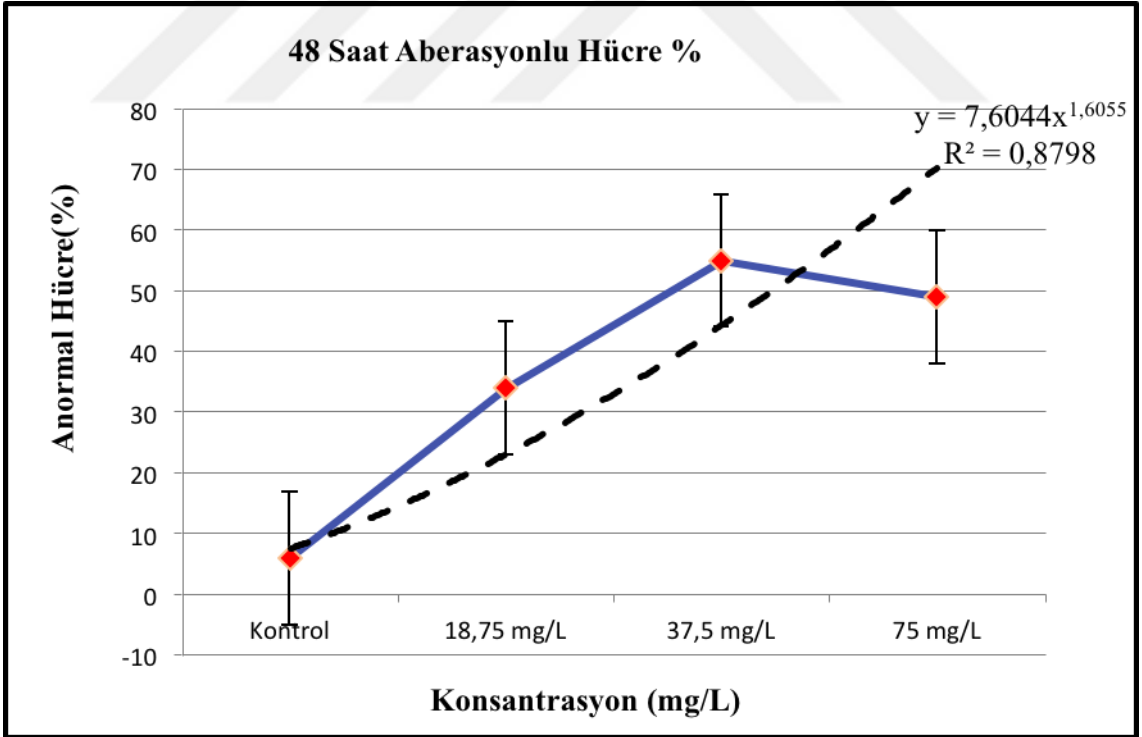
*İstatistiksel olarak anlamlılık düzeyini ifade etmektedir.

24, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda süre ve doza bağlı olarak kromozomal aberasyon sayılarındaki değişimler grafikler halinde Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'te gösterilmektedir.

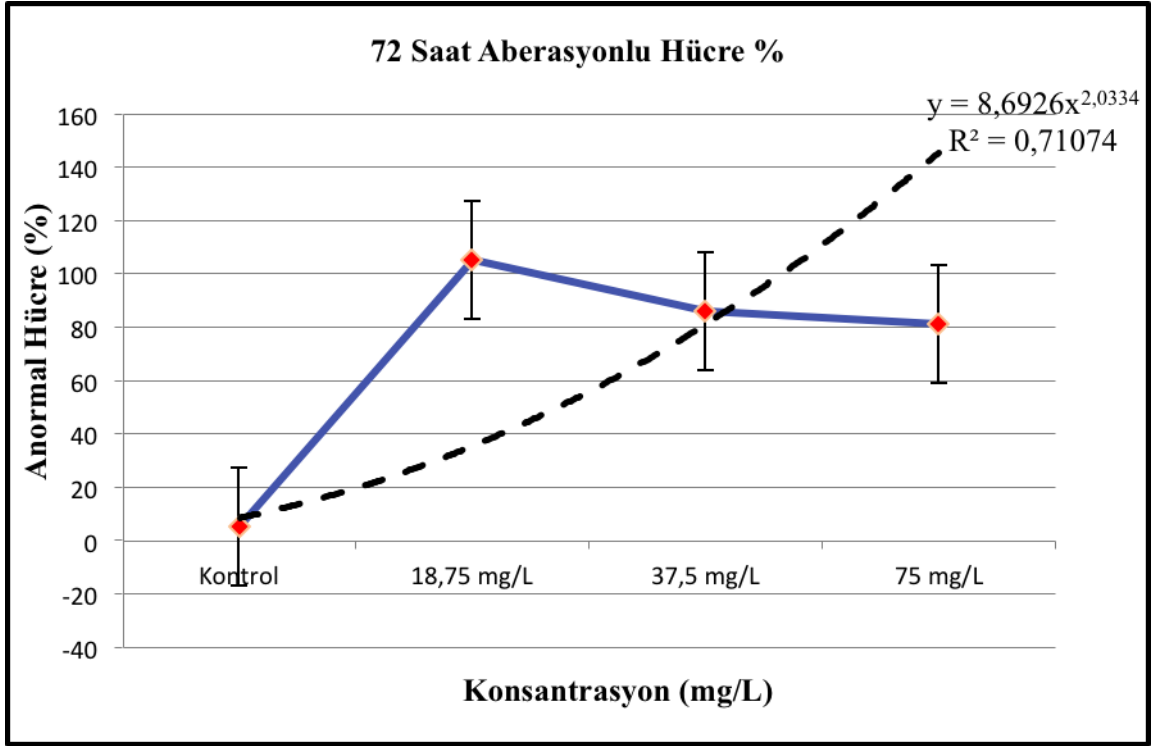
Tüm uygulamalarda gözlenen kromozomal anormallik yüzdeleri incelendiğinde; % 43.75 C-mitoz, % 25.3 metafazda ekvatorial tabla kayması, % 15 anafazda kutup kayması, % 14.7 telofazda kutup kayması ve % 2.25'lik kısmında diğer aberasyonlar tarafından oluşturduğu belirlenmiştir.



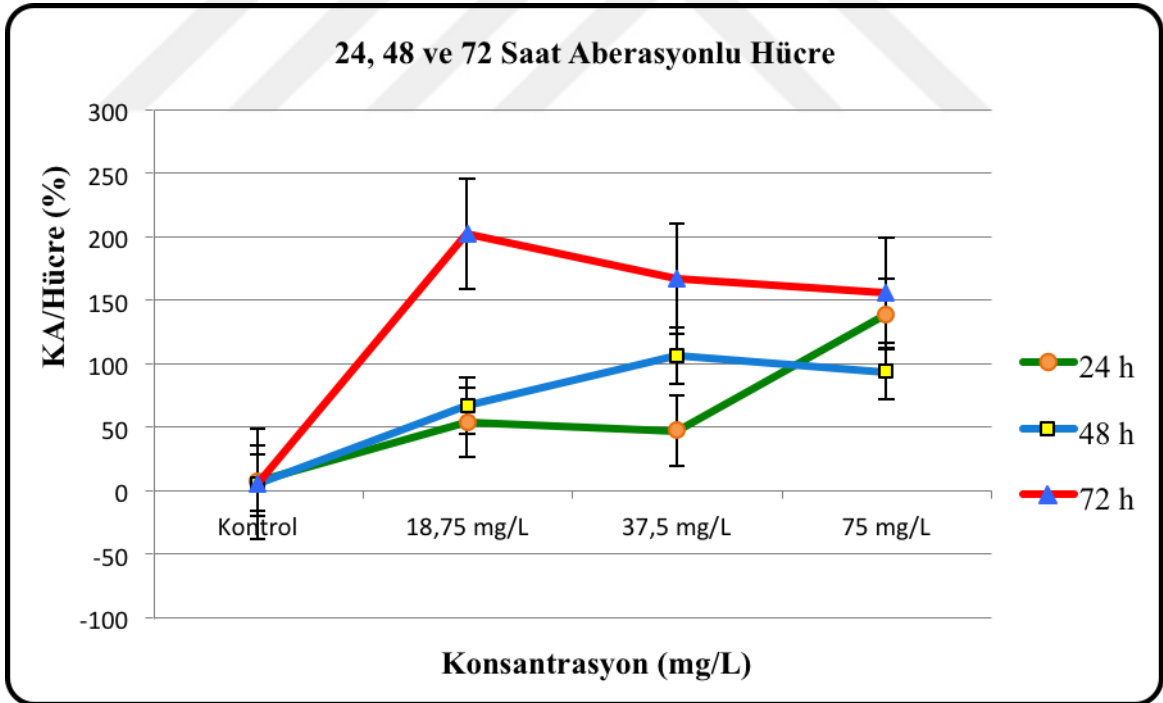
Şekil 4.11. 24 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri



Şekil 4.12. 48 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri



Şekil 4.13. 72 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri



Şekil 4.14. 24, 48 ve 72 Saatlik AA uygulaması sonrası aberasyonlu hücre yüzdeleri

4.4. *Tradescantia pallida* H. Stamen Tüyü Analizi Bulguları

Yapılan Trad-STM (*Tradescantia* Stamen Tüyü Mutasyonu) analizinde, AA'in daha önce belirlenen 4 farklı konsantrasyonu (18.75, 37.5, 75, 95 mg/L), negatif kontrol (saf su) ve pozitif kontrol (dodine) ile muamele edilmiş, her bir uygulama grubu için 5-10 adet canlı çiçek incelenmiştir. Stereo mikroskopi ile her bir grup için yaklaşık 1000 stamen hücresi gözlemlenmiş ve 3 tekrarlı olarak toplam 3000 hücre incelenmiştir.



Şekil 4.15. *Tradescantia pallida* H. çiçeği stereo mikroskop görüntüsü

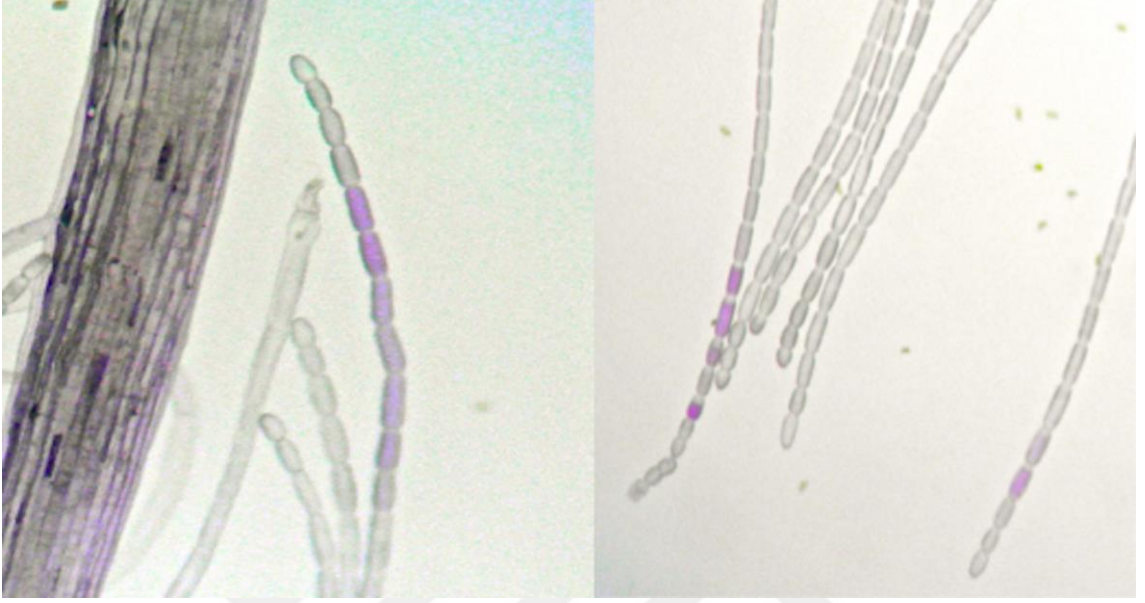
4.4.1. Trad-STM Görselleri

Negatif kontrol grubundaki bitkilere sadece saf su uygulanmış olup, incelemeler sonucu görülen, renksiz şeffaf haldeki stamen tüyleri Şekil 4.16.'te gösterilmektedir.



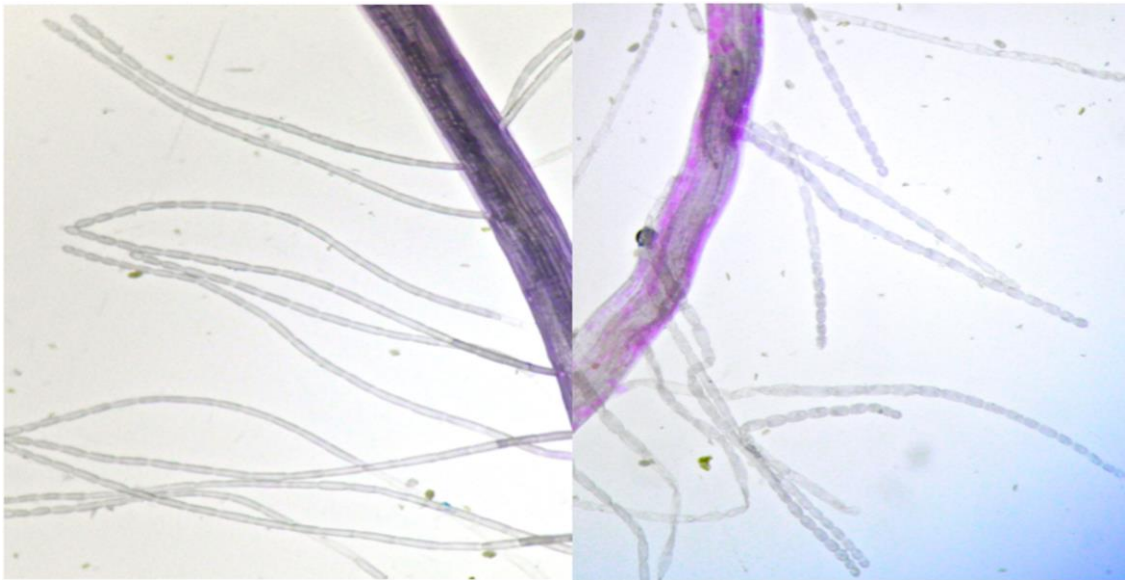
Şekil 4.16. Negatif kontrol grubu. Renksiz stamen hücreleri

Pozitif kontrol olarak, *T. pallida* üzerindeki etkisi bilinen fungusit, Dodine (0,16 mL/L) uygulanmıştır. Şekil 4.17.'da Dodine uygulaması sonrası görülen pembe renkli hücreler gösterilmektedir.



Şekil 4.17. Pozitif kontrol grubu. Pembe mutasyonlu stamen hücreleri

24, 48 ve 72 saatlik AA uygulamalarında EC₅₀ ile belirlenmiş olan, 18.75, 37.5 ve 75 mg/L konsantrasyonundaki çözeltiler, *T. pallida*'ya uygulandığında pembe mutasyon oluşumu gözlenmemiştir. Bununla ilgili görseller Şekil 4.18., 4.19., 4.20.'de gösterilmektedir.



Şekil 4.18. 24 saat 75 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri

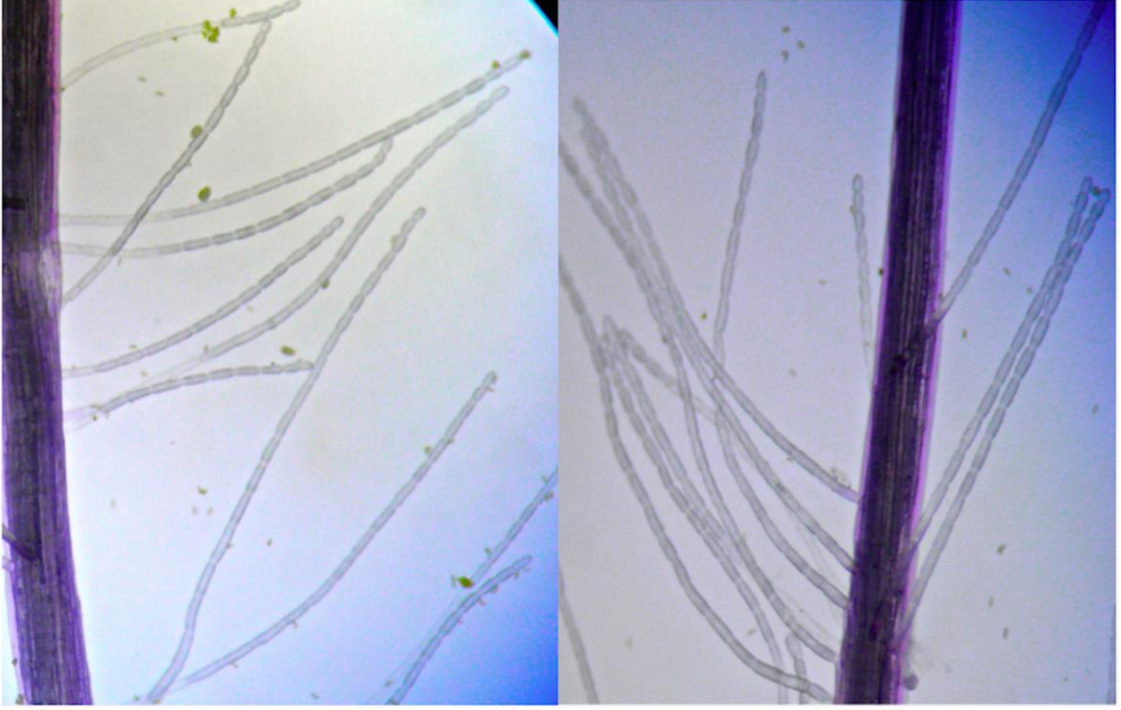


Şekil 4.19. 48 saat 75 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri

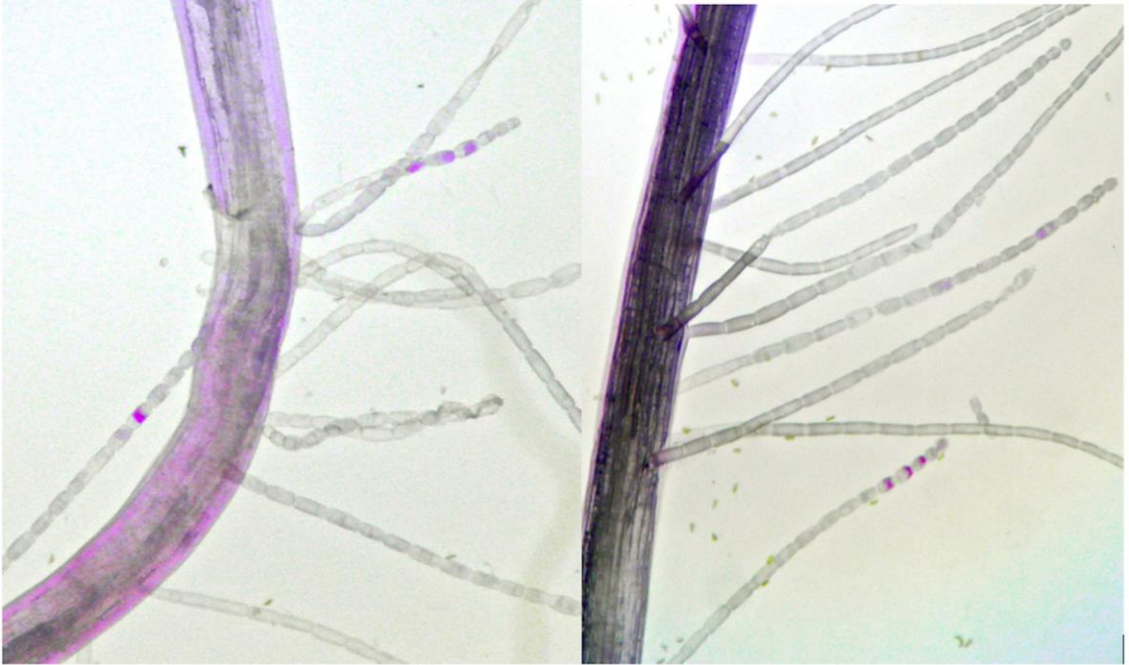


Şekil 4.20. 72 saat 75 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri

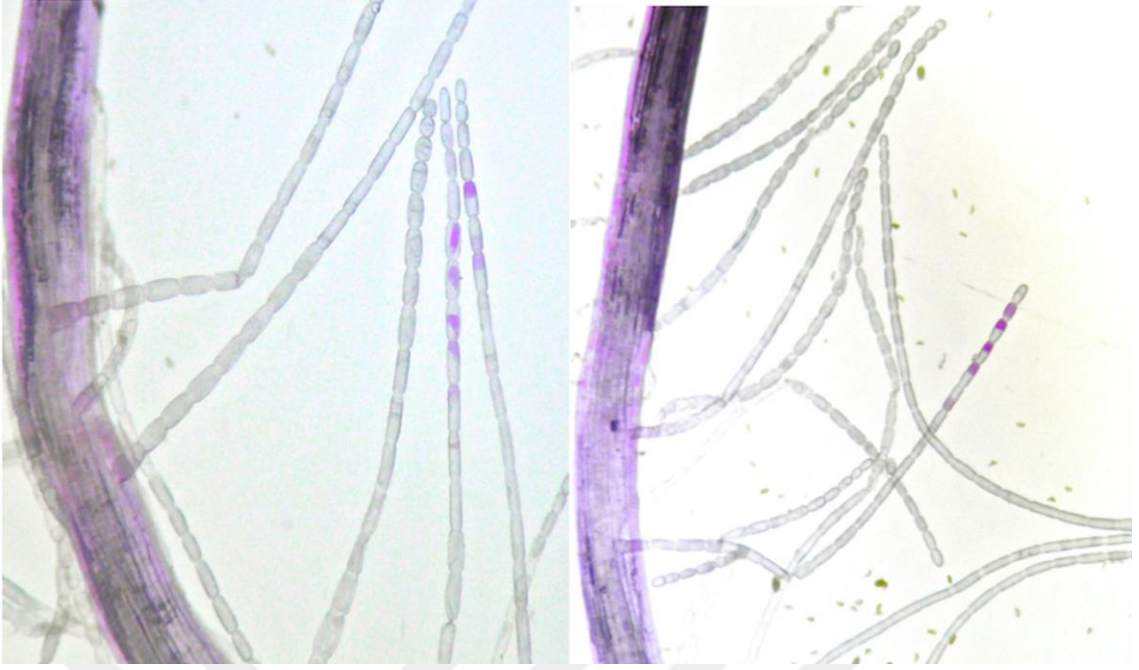
AA belirlenen dozları pembe mutasyon oluşturmadığı için bu dozların üzerine çıkılarak uygulanan 95 mg/L'lik deneme sonucunda 24 saat sonunda pembe mutasyon görülmezken, 48 ve 72 saatlik uygulamalarda pembe mutasyon oluşumu tetiklenmiştir. Şekil 4.21., Şekil 4.22., Şekil 4.23., Şekil 4.24.'de bu sonuçlar ile ilgili görseller verilmiştir.



Şekil 4.21. 24 saat 95 mg/L AA uygulaması. Renksiz stamen hücreleri



Şekil 4.22. 48 saat 95 mg/L AA uygulaması. Pembe mutasyonlu hücreler



Şekil 4.23. 72 saat 95 mg/L AA uygulaması. Pembe mutasyonlu hücreler

4.4.2. Trad- STM Bulguları

AA uygulamalarında 24, 48 ve 72 saatlik muamelelerde, 18.75, 37.5 ve 75 mg/L'de sayılan 3000'e yakın hücre incelenmiş ve bu hücrelerin içerisinde pembe mutasyon oluşumu gözlenmemiştir.

Bunun üzerine belirlenen etki konsantrasyonlarının üzerine çıkılarak 95 mg/L ve 115 mg/L konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlanarak uygulama gerçekleştirilmiştir. 95 mg/L'lik çözelti *T. pallida*' ya uygulanmıştır ve sonuçlar yaklaşık 3000 hücre incelendiğinde, 24 saatlik uygulamada pembe mutasyon oluşmazken, 48 saatte 19 adet ve 72 saatte 79 adet pembe mutasyonlu hücre belirlenmiştir. Ancak, 115 mg/L'lik uygulama grubunda yer alan deney bitkilerinin zarar görmesi nedeniyle çiçek oluşumu görülmemiştir, deney bitkilerin ölümü ile sonlandırıldığı için herhangi bir mutasyon verisi kaydedilememiştir.

Sadece saf su uygulanan negatif kontrol grubunda pembe mutasyonlu hücre oluşumu görülmemiştir. Pembe mutasyon oluşum yüzdeleri; 48 saatlik uygulama sonrasında, pozitif kontrolde % 0,7 iken 95 mg/L'lik AA uygulamasında % 0,63 olarak belirlenmiştir; 72 saatlik uygulama sonrasında ise; pozitif kontrolde % 1,43 iken 95 mg/L'lik AA uygulamasında % 2,63 olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 4.7. Uygulamalara göre belirlenen pembe mutasyonlu hücreler.

Uygulama Dozu	Pembe mutasyonlu hücre sayısı		
	24 Saat	48 Saat	72 Saat
Negatif Kontrol	-	-	-
Pozitif Kontrol	-	21	43
18,75 mg/L	-	-	-
37,5 mg/L	-	-	-
75 mg/L	-	-	-
95 mg/L	-	19	79
115 mg/L	-	-	-

4.5. Tartışma

İnsanlar ve diğer organizmalar için tehlikeli olan çevresel mutajenlerin, kimyasal ve fiziksel ajanların genotoksik aktivitesini tespit etmek ve sonuçlarını izlemek için kullanılan birçok test yöntemi bulunmaktadır. “*Allium cepa* L. Kök ucu hücre testi” ve “*Tradescantia pallida* stamen tüyü pembe mutasyon testi” sıklıkla kullanılmakta olan, basit ve güvenilir test sistemlerindedir (Levan, 1938; Ma, 1981).

Gıda katkıları ve koruyucuları günlük yaşantımızda sık sık karşılaşmakta olduğumuz tehlike potansiyeline sahip maddelerdir. Kullanılan doza dikkat edilmediği takdirde sağlık üzerinde olumsuz etkiler oluşturabilmektedirler. Bu nedenle tüketilmekte olan GKM’lerinin, kullanılabilir en yüksek konsantrasyonlarının belirlenmesi ve bu konsantrasyonların oluşturabileceği biyolojik, sitolojik ve toksikolojik etkilerin kesin ve net olarak ortaya koyulabilmesi oldukça önem arz etmektedir.

AA oluşturduğu toksikolojik etkiler bakımından oldukça tartışılır bir maddedir. Astım, hiperaktivite ve iritasyon gibi çeşitli patolojilere sebep olduğu ortaya koyulmuşken, toksikolojik etkilerinin neler olduğu tam olarak bilinmemektedir (Doğruyol, 2006). Çeşitli toksikolojik testler kullanılarak AA’nin meydana getirebileceği etkiler ortaya koyulmuştur. Fakat bu çalışmaların birçoğu deney hayvanları üzerinde gerçekleştirilmişken, bitkilerin kullanıldığı çalışma kaynakları oldukça sınırlıdır. Literatür incelemelerimiz sırasında AA’in kök ucu hücrelerindeki, kromozomal aberasyonların ve mitotik aktivitenin incelendiği bir çalışma olmadığı belirlenmiştir.

AA akut etkilerinin incelendiği bir çalışmada akut oral ve akut intravenöz etkileri erkek albino fareler üzerinde incelenirken, akut intraperitonel etkileri ratlar kullanılarak

belirlenmiştir. Akut oral etkiler; mide ve bağırsak distansiyonu ile birlikte çekum spastik konsantrasyonu olarak gözlemlenmiştir, ayrıca bağırsak tahrişi ve iritasyonu dikkat çekmiştir. Akut intravenöz etkileri ise hemorajik akciğerler olarak görülmüştür. Akut intraperitonel etkiler bağırsak iritasyonu, hemorajik akciğerler ve visseral organlarda iritasyon ile yapışıklık olarak belirlenmiştir (Horn ve ark., 1957).

AA dışında türevleri de birçok alanda sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan Di(2-etilheksil) adipat (DEHA) diyet olarak uygulanarak, sıçan karaciğer ve böbrek DNA'sındaki 8-Hidroksideoksiguanozin (8-OH-dG) seviyeleri incelenmiştir. Karaciğer, DEHA tarafından oluşturulan kanserojenizde hedef organ olarak bilinmektedir ve DEHA verilen sıçanların karaciğerinde, 8-OH-dG düzeylerinde belirgin artışlar, gözlemlenmiştir. Sonuçlar, peroksizom proliferatörleri tarafından hepatokarsinogenezide, oksidatif DNA hasarının bulunduğunu göstermiştir (Takagi ve ark., 1990).

Çalışmamızın başlangıç aşamasında yapılan KBİT sonuçları, AA artan konsantrasyonunun soğan kök ucu uzamasını engellediğini, yani çimlenmeyi inhibe ettiğini göstermiştir. Pirinç (*Oryza sativa*) ile yapılan bir çalışmada farklı konsantrasyondaki AA çözeltileri pirinç tohumlarına uygulanmış, çimlenme ile fide büyümesi üzerine etkileri incelenmiştir. Deney süresi sonunda elde edilen sonuçlar ile kontrole kıyaslandığında doz artışına bağlı olarak, AA'in çimlenme ve fide oluşumunu baskıladığı sonucu ortaya koyulmuştur (Matsui ve ark., 2001). Bu veriler elde ettiğimiz sonuçlar ile benzerlik göstermekle beraber, doğrular niteliktedir.

KBİT uygulanarak köklerden elde edilen makroskopik veriler ışığında, EC₅₀ belirlenmiş ve uygulamalarda bu değer temel alınarak mikroskopik incelemeler gerçekleştirilmiştir. *A. cepa* ve *T. pallida*, hücre siklusunu yaklaşık 24 saatte tamamlanmaktadır, bu nedenle uygulama süresi 24, 48 ve 72 olarak ayarlanarak bir kaç siklusta oluşan etkiler ortaya koyulmak istenmiştir. Mitotik indeks ve kromozomal aberasyon testi için her bir uygulama 5000 hücre görüntülenerek incelemeler gerçekleştirilirken, stamen tüyü somatik mutasyon testi için her bir uygulama da 3000 stamen hücresi görüntülenmiştir.

Çalışmamız sonunda elde edilen veriler, kullanılan AA'in, ilgili kontroller ile karşılaştırıldığında mitotik indekste istatistiksel olarak anlamlı bir değişim ile mitoz bölünmeyi inhibe ettiğini ortaya koymaktadır. Bunun yanında kromozomal aberasyon oluşumu frekansında artış görülmüştür, bu veriler AA'in potansiyel genotoksik etkilerini ortaya koymaktadır. Yapılan birçok çalışma ile yüksek miktarda kullanılan gıda katkılarının mitotik indekste azalmaya ve bununla beraber DNA sentezinin inhibisyonuna neden olabileceği

gösterilmiştir. Bu sonuçlar AA'inde bu etkiler ortaya çıkarabileceğini destekler niteliktedir (Duran ve Akı, 2017; Nunes ve ark., 2017).

Mitotik indekste azalma görülmesi, meristem hücrelerindeki mitoz bölünmenin belli oranda inhibe edildiğini göstermektedir. Bu durum kullanılan kimyasalın hücre bölünmesinde görevli kromozom ve bölünme proteinlerine etki etmesi veya hücre ölümüne neden olması ile oluşan, sitotoksik ve antiproliferatif etkiden kaynaklanabilmektedir (Sousa Sales ve ark., 2017).

Mitotik aktivitede azalma, G1 fazının bloke edilmesi ile DNA sentezinin inhibe edilmesinden kaynaklanabileceği (Schneiderman ve ark., 1971) gibi hücre döngüsünün gidişatını belirleyen G2 fazının bloke edilerek, hücrenin mitoz girme sürecine ket vurulmasından da kaynaklanabilmektedir (Van't Hof, 1968). DNA sentezinin inhibe edilmesi, mitokondri üzerine kimyasalın etki etmesi ile ATP seviyesinde azalmaya da bağlı da olabilmektedir (Pandey ve ark., 2014).

Mikroskopik incelemeler sırasında en fazla görülen kromozomal aberasyonlar; anafaz ve telofazda kutup kayması, C-mitoz, metafazda tabla kayması, köprü oluşumlarıdır. Bunların yanı sıra çok sayıda spiral çözünme ve kontraksiyona uğrayan kromozomlar gözlenmiştir. Bu iki etki, uygulanan AA'in aynı zamanda kromozom oluşumunda görevli histon proteinleri üzerine etkisinin olabileceğini gösterir niteliktedir.

Mitotik aberasyonların frekansındaki artma, uygulanan kimyasalın mitotik iğ üzerine direkt etki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu direkt etki birçok kromozomal anormalliği ortaya çıkarmaktadır. Çalışmamızın sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında AA uygulamalarının tümünde, mitotik aberasyonlarda anlamlı bir artış olduğu gözlemlenmiştir.

C-mitoz oluşumu, gıda katkılarının kolşisine benzer bir etki meydana getirerek iğ ipliği oluşumunun engellenmesi ve kısalıp kalınlaşmış metafaz kromozomlarının ekvatorial plağa çekilmesinin önlenmesi ile oluşan bir durumdur. Böyle bir engelleme mitotik indeks inhibisyonuna neden olan etmenlerden biri olabilir (Levan, 1938).

Köprü oluşumları, gıda katkılarının kromozomal proteinleri etkilemesi sonucu oluşan fizyolojik sonuçlardır. Mitozun anafaz ve telofaz safhalarında belirlenen bu oluşumlar, kromozom ve kromatidlerde meydana gelen kırılmalar, füzyonlar ile oluşan yapışkan uçların birbirine tutunması ile meydana gelebileceği gibi (Türkoğlu, 2007) kromatidlerin yanlış katlanmasından veya kromozomların subkromatid köprüler ile bağlanmasından da kaynaklanabilir. Ayrıca kromozomal köprü oluşumları, kromozom segmentlerin de eşit olmayan translokasyon ve inversiyona bağlı olabilir. Bu oluşum ardından kromozomal yapışkanlık ve bunun beraberinde anafaz ve telofaz ayrılmasındaki başarısızlığı meydana

getirebilir (Gömürgen, 2005). Kromo-yapışkanlık genellikle hücre ölümüne yol açan geri dönüşümü olmayan tipte, yüksek derecede toksik etkiler meydana getirmektedir. Bu sonuçlar, farklı kimyasalların farklı materyaller üzerindeki etkilerini inceleyen birçok araştırma grubunun sonuçları ile paralellik göstermektedir (Klasterska ve ark., 1976; McGill ve ark., 1974).

Kalgın kromozom oluşumu, mitoz safhaları gerçekleşirken kromozomların olması gerektiği safhaya diğer kromozomlarla aynı anda gidememesinden ve geride kalmasından kaynaklanmaktadır. Bu etki iğ ipliklerinde meydana gelen harabiyetten kaynaklanabileceği gibi asentrik kromozomların iğ ipliklerine tutunamadığı için hareket etmemesinden de kaynaklanabilmektedir (Gömürgen, 2005). Bu gibi kromozomal köprü oluşumlarının ve kromozomal gecikmelerin diğer kimyasallar tarafından da indüklendiği belirlenmiştir.

Multipolar oluşumlar, anafazda ve telofazda kutupların ayrılmasının başarısız olduğunu ve eşit olmayan translokasyonun meydana geldiğinin gösterir. İğ ipliğindeki bozulmalara bağlı olarak kromozomların düzensiz dağılımdan kaynaklanabilmektedir.

Kimyasal ya da fiziksel ajanların genotoksik aktivitesini tespit etmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biri de *Tradescantia* stamen tüyü somatik mutasyon testidir. İnsanlar ve diğer organizmalar için tehlikeli olan çevresel mutajenleri izlemek için kullanılabilir. Bu test, *Tradescantia* stamen tüyü hücrelerinin sahip olduğu renk bakımından heterozigotluğuna dayanmaktadır.

Çalışmamızda *Tradescantia* ya yapılan AA uygulaması sonucunda EC₅₀ testi ile belirlenen 3 farklı konsantrasyona pembe mutasyon oluşumu yönünden hassasiyet gözlemlenmezken, ancak bu dozların üzerine çıkılan uygulamada (95 mg/L) pembe mutasyon oluşumu gözlenmiştir. Literatürde karşımıza çıkan bazı çalışmalarda, maddelerin farklı bitki testlerinde de, farklı hasasiyette sonuçlar gösterdiği ortaya koyulmuştur. Kimyasalların etkileri incelenirken farklı test sistemlerinin kombinasyonlarının kullanılması sonuçların güvenilirliği açısından önemlidir.

AA genotoksitesini belirlemek için *A. cepa* gerekli duyarlılığı gösterirken, *T. pallida*'da daha az etkili olmuştur. Bu farklılık bitkilerin fizyolojik özelliklerinden ve kimyasalın oluşturduğu strese verilen yanıtın değişiklik göstermesinden kaynaklanabilmektedir. Bu yönden yapılan bazı çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Ilhan ve Akı, 2009; de Rainho ve ark., 2010; Alvarez-Moya ve ark., 2001).

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmamız kapsamında, *Allium cepa* L. ve *Tradescantia pallida* H. türleri kullanılarak, etkileri tam olarak bilinmeyen AA'in canlı organizmalar üzerindeki etkileri ortaya koyulmuştur.

A. cepa kök ucu hücre testi denemeleri; 3 farklı (18.25 mg/L, 37.5 mg/L ve 75 mg/L) AA çözeltisinin 24, 48 ve 72 saat süre ile kök uçlarına uygulanması ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen MI verileri uygulanan 3 çözeltinin 24 saatlik uygulama da sırasıyla, % 38,71, % 43,32 ve % 54,13; 48 saatlik uygulamada sırasıyla, % 55,05, % 60,75 ve % 66; 72 saatlik uygulamada sırasıyla, % 53,95, % 63,49 ve % 71,17 olacak şekilde mitotik aktivitede azalmaya neden olduğunu göstermiştir.

Aynı şekilde uygulanan 3 farklı AA çözeltisi kromozomal aberasyon oluşum sıklığında artışa neden olmuştur. En sık görülen kromozomal aberasyonlar şunlardır; C-mitoz (% 43.75), metafazda ekvatorial tabla kayması (% 25.3), anafazda kutup kayması (% 15), telofazda kutup kayması (% 14.7). Bahsi geçen aberasyonlar dışında anafaz/telofaz köprü oluşumu, yapışkanlık, vagrant kromozom, laggard kromozom, anafazda multipolar oluşumu ve kalgın kromozom oluşumlarında gözlenmiştir. Ayrıca AA'in histon proteinlerine etki etmesi nedeniyle oluşan spiral çözünme ve kontraksiyon oluşumlarında belirlenmiştir.

T. pallida stamen tüyü analizi için yapılan uygulamalarda; 24, 48 ve 72 saat süre ile gerçekleştirilen, 18.25 mg/L, 37.5 mg/L, 75 mg/L çözelti denemeleri, stamen hücrelerinde pembe mutasyon oluşumu meydana getirmezken, 95 mg/L'lik çözeltinin 48 saatlik uygulamasında 19 adet ve 72 saatlik uygulamasında ise 79 adet hücrede pembe mutasyon oluşumu belirlenmiştir. 115 mg/L'lik AA çözeltisi bitki gruplarına zarar vermesi nedeniyle herhangi bir inceleme gerçekleştirilememiştir. *T. pallida* için AA'in letal (ölümcül) konsantrasyonu 115mg/L olarak belirlenmiştir.

Araştırmamızda kullandığımız, model bitkilerden *A. cepa* ve *T. pallida*, AA'in farklı konsantrasyonlarında ve uygulama sürelerinde yapılan uygulamalara, birbirlerinden farklı tepkiler göstermiştir. Bunun sebebi *A. cepa* türünün, uygulanan AA konsantrasyonlarına karşı hasasiyet göstermesi olabilir. *T. pallida* ise çok daha yüksek konsantrasyonlarda bile sitotoksikite ve genotoksikite oluşturması açısından AA'e daha toleranslıdır.

Çalışmamız ile elde edilen sonuçlar AA'in bitkisel materyal üzerinde genotoksik ve sitotoksik etki gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Bu etki gıda, ilaç ve kozmetik sanayisinde kullanılmakta olan katkı maddeleri ve kimyasal miktarlarının toksik etki

oluşturabilmesi bakımından önemli olduğunu ve kullanımının gerekli olduğu durumlarda uzman kişiler tarafından, belirlenen dozlar göz önüne alınarak kullanılmasının gıda güvenliği, insan ve toplum sağlığının korunması açısından önemli ve gerekli olduğunu ortaya koymaktadır.



KAYNAKLAR

- Abd El-Wahab H. M. F., El-Deen Moram G. S., 2012. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 29 (2): 224–232.
- Abulreesh H. H., Elbanna K., Sarhan O. M., Khider M., Elmogy M., Shaaban M. R., 2017. Microbiological, histological, and biochemical evidence for the adverse effects of food azo dyes on rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25 (3): 667–680.
- Akbel Kimya. 2017. Adipik Asit. 29 Kasım 2017. <http://akbelkimya.com.tr/adipik-asit-186-urun>
- Akı C., Çördük N., 2011. Genetik Laboratuar Kitabı. Kriter Yayınları. İstanbul.
- Al-Shabib N. A., Khan J. M., Ali M. S., Al-Lohedan H. A., Khan M. S., Al-Senaïdy A. M., Husain F. M., Shamsi M. B., 2017. Exploring the mode of binding between food additive “butylated hydroxytoluene (BHT)” and human serum albumin: Spectroscopic as well as molecular docking study. *Journal of Molecular Liquids*, 230: 557–564.
- Alvarez-Moya C., Santerre-Lucas A., Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Padilla-Camberos E., Feria-Velasco A., 2001. Evaluation of genotoxic activity of maleic hydrazide, ethyl methane sulfonate, and N-nitroso diethylamine in *Tradescantia*. *Salud Publica de Mexico*, 43 (6): 563–569.
- Amato-Lourenco L. F., Lobo D. J. A., Guimarães E. T., Moreira T. C. L., Carvalho-Oliveira R., Saiki M., Saldiva P. H. N., Mauad T., 2017. Biomonitoring of genotoxic effects and elemental accumulation derived from air pollution in community urban gardens. *Science of the Total Environment*, 575: 1438–1444.
- Andra S. S., Makris K. C., 2012. Thyroid Disrupting Chemicals in Plastic Additives and Thyroid Health. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 30 (2): 107–151.
- Anonim. 1994. Adipik Asit. 20 Ekim 2017. <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~8pYIcJ:10>
- Bastaki M., Farrell T., Bhusari S., Pant K., Kulkarni R., 2017. Lack of genotoxicity in vivo for food color additive Allura Red AC. *Food and Chemical Toxicology*, 105: 308–314.
- Başbakanlık Mevzuatı Geliştirme ve Yayın Genel Müdürlüğü. 2013. Resmî Gazete. T. C. Resmi Gazete. Ankara. 20 Kasım 2017.

<http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/06/20130630-4.htm>

- Becaro A. A., Siqueira M. C., Puti F. C., de Moura M. R., Correa D. S., Marconcini J. M., Mattoso L. H. C., Ferreira M. D., 2017. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticle/carboxymethyl cellulose on *Allium cepa*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189 (7).
- Boğa A., 2010. Gıda Katkı Maddelerinin İnsan Sağlığına Etkileri. *Çukurova Üniversitesi Arşivi*, 19 (January): 141–152.
- Campos C. F., de Júnior E. O. C., Souto H. N., de Sousa E. F., Pereira B. B., 2016. Biomonitoring of the environmental genotoxic potential of emissions from a complex of ceramic industries in Monte Carmelo, Minas Gerais, Brazil, using *Tradescantia pallida*. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 79 (3): 123–8.
- Carocho M., Barrerio M. F., Morales P., Ferreira I. C. F. R., 2014. Adding Molecules to Food , Pros and Cons : A Review on Synthetic and Natural Food Additives. *Institute of Food Technologists*, 13: 377–399.
- Čėsniėnė T., Kleizaitė V., Bondzinskaitė S., Taraškevičius R., Žvingila D., Šiukšta R., Rančelis V., 2017. Metal bioaccumulation and mutagenesis in a *Tradescantia* clone following long-term exposure to soils from urban industrial areas and closed landfills. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 823(Supplement C): 65–72.
- Connolly A., Hearty Á., Nugent A., McKeivitt A., Boylan E., Flynn A., Gibney M. J., 2010. Pattern of intake of food additives associated with hyperactivity in Irish children and teenagers. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27 (4): 447–456.
- Costa G. M. da, Petry C. T., Droste A., 2016. Active Versus Passive Biomonitoring of Air Quality: Genetic Damage and Bioaccumulation of Trace Elements in Flower Buds of *Tradescantia pallida* var. *purpurea*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 227:229.
- Çördük N., Akıncı N., Nergis K., Akı C., 2015. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of dodine (1-dodecylguanidium acetate) by *Allium* test. *Fresenius Environmental Bulletin*, 24 (12A): 4527–4531.
- da Silveira Fleck A., Carneiro M. F. H., Barbosa F., Thiesen F. V., Amantea S. L., Rhoden C. R., 2016. Monitoring an outdoor smoking area by means of PM2.5 measurement and vegetal

- biomonitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 23 (21): 21187–21194.
- de Rainho C. R., Kaezer A., Aiub C. A. F., Felzenszwalb I., 2010. Ability of *Allium cepa* L. root tips and *Tradescantia pallida* var. *purpurea* in N-nitrosodiethylamine genotoxicity and mutagenicity evaluation. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 82 (4): 925–932.
- Deng Y., Mao Y., 2015. Production of adipic acid by the native-occurring pathway in *Thermobifida fusca* B6. *Journal of Applied Microbiology*, 119 (4): 1057–1063.
- Dilek B. Y., 2013. Ergene Nehri Suyunun *Secale cereale* L. Tohumunun Çimlenmesi ve Kök Ucu Mitoz Bölünme Üzerine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Trakya Üniversitesi, Türkiye.
- Doğruyol H., 2006. Gıdalardaki Katkı Maddeleri ve Zararları; Çocukluk Hiperaktivitesi. *Güncel Pediatri*, 2: 42–48.
- Duran N., Akı C., 2017. Effects of Umami Substances Monosodium Glutamate (MSG) and Ribonucleotides (GMP / IMP) on Mitotic Index in *Allium cepa* L . *Plant. Scholars Research Library*, 8 (3): 18–23.
- Çalışır E. Z., Çalışkan D., 2003. Food Additives and Effects on the Human Health. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (3): 193–206.
- Erdoğan Y., 2008. Çeşitli Gıda Katkı Maddelerinin *Allium cepa* L. 'de Mitoz Bölünme, Kromozomlar ve DNA Miktarı Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Cumhuriyet Üniversitesi, Türkiye.
- Erkmen O., 2010. Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi, 220–235.
- Fadic X., Placencia F., Dominguez A. M., Cereceda-Balic F., 2017. *Tradescantia* as a biomonitor for pesticide genotoxicity evaluation of iprodione, carbaryl, dimethoate and 4,4'-DDE. *Science of the Total Environment*, 575: 146–151.
- Farine J., Legal L. U. C., Moreteau B., I J. L. E. Q., Laboratoire I., Recherches D., Sully R., De L. M., Sud U. P., Cedex O., Populations L., Yvette G., Recherches L. De, Bourgogne U. De, De L., F- G., 1996. Volatile Components of Ripe Fruits of *Morinda citrifolia* and Their Effects on *Drosophila*. *Science*, 4 (2): 433–438.
- Fiskesjö G., 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 102 (1): 99–112.

- Flors V., Miralles C., González-Bosch C., Carda M., García-Agustín P., 2003. Three novel synthetic amides of adipic acid protect *Capsicum annuum* plants against the necrotrophic pathogen *Alternaria solani*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63: 151–158.
- Food and Agriculture Organization. 2017. Kimyasal riskler ve JECFA. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 29 Kasım 2017. <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>
- Gömürgen A. N., 2005. Potassium Nitrate Food Preservative on Root Tips of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70 (2): 119–128.
- Grant W. F., 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research Regular Papers*, 310 (2): 175–185.
- Haile T. M., Mišák M., Grummt T., Halh A. S., Pichler C., Knasmueller S., Fuerhacker M., 2016. Cytotoxic and genotoxic activities of waters and sediments from highway and parking lot runoffs. *Water Science and Technology*, 73 (11): 2772–2780.
- Hobbs C. A., Saigo K., Koyanagi M., Hayashi S., 2017. Magnesium stearate, a widely-used food additive, exhibits a lack of in vitro and in vivo genotoxic potential. *Toxicology Reports*, 4: 554–559.
- Horn H. J., Holland E. G., Hazleton L. W., 1957. Safety of Adipic Acid as Compared with Citric and Tartaric Acid. *Agricultural And Food Chemistry*, 5 (10): 759–762.
- Household Products Database. 2017. Adipik Asit İçeren Ürünler - Household Products Database. 19 Kasım 2017. <https://hpd.nlm.nih.gov/cgi-bin/household/brands?tbl=chem&id=986>
- Ichikawa S., Takahashi C. S., 1977. Somatic Mutation Frequencies In The Stamen Hairs Of. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 45: 195–204.
- Ilhan D., Akı C., 2009. Evaluation of genetic effects of some genotoxic compounds in *Tradescantia pallida* H. with micronucleus and stamen-hair mutation tests. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18 (10): 1828–1831.
- Joo J. C., Khusnutdinova A. N., Flick R., Kim T., Bornscheuer U. T., Yakunin A. F., Mahadevan R., 2017. Alkene hydrogenation activity of enoate reductases for an environmentally benign biosynthesis of adipic acid. *Chem. Sci.*, 8 (2): 1406–1413.
- Kaluzna-Czaplinska J., Socha E., Rynkowski J., 2011. B vitamin supplementation reduces

- excretion of urinary dicarboxylic acids in autistic children. *Nutrition Research*, 31: 497–502.
- Kawaguchi M., Yamazaki T., Nakazawa H., 2002. Biological effects of di(2-ethylhexyl)adipate. *Environmental Sciences: an International Journal of Environmental Physiology and Toxicology*, 9 (2–3): 198.
- Klasterska I., Natarajan A. T., Ramel C., 1976. An interpretation of the origin of subchromatid aberrations and chromosome stickiness as a category of chromatid aberrations. *Hereditas*, 83: 153–162.
- Köhle Ü., Demir C. Y., 2003. Oftalmik Cerrahide Sütür Materyalleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10 (4): 217–221.
- Kruyer N. S., Peralta-Yahya P., 2017. Metabolic engineering strategies to bio-adipic acid production. *Current Opinion in Biotechnology*, 45: 136–143.
- Kuhn A. W., Tedesco M., Laughinghouse H. D., Flores F. C., Silva C. de B. da, Canto-Dorow T. S. do, Tedesco S. B., 2015. Mutagenic and antimutagenic effects of *Eugenia uniflora* L. by the *Allium cepa* L. test. *Caryologia*, 68 (1): 25–30.
- Leme Morais D., Marin-Morales M. A., 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 682 (1): 71–81.
- Levan A., 1938. The Effect of Colchicine On Root Mitoses In *Allium*. *Hereditas*, 471–486.
- Levan A., 1945. Cytological Reactions Induced by Inorganic Salt Solutions. *Nature*, 156: 751.
- Li X., Wu D., Lu T., Yi G., Su H., Zhang Y., 2014. Highly Efficient Chemical Process To Convert Mucic Acid into Adipic Acid and DFT Studies of the Mechanism of the Rhenium-Catalyzed Deoxydehydration. *Angewandte Chemie International Edition*, 53 (16): 4200–4204.
- Ma T.-H., 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environmental Health Perspectives*, 37(January): 85–90.
- Maisanaba S., Prieto A. I., Puerto M., Gutiérrez-Praena D., Demir E., Marcos R., Cameán A. M., 2015. In vitro genotoxicity testing of carvacrol and thymol using the micronucleus and

- mouse lymphoma assays. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 784–785 (Supplement C): 37–44.
- Matsui Y., Pramanik M. H. R., Minesaki Y., Yamamoto T., Nakano H., 2001. Growth inhibitors in rice-straw extracts and their effects on Chinese milk vetch (*Astragalus sinicus*) seedlings. *Weed Biology and Management*, 1 (2): 133–136.
- Mattson V. R., Arthur J. W., Walkbridge C. T. 1976. Acute Toxicity of Selected Compounds to Fathead minnows. Environmental Research Laboratory.
- Mcgill M., Pathak S., Hsu T. C., 1974. Effects of ethidium bromide on mitosis and chromosomes: a possible material basis for chromosome stickiness. *Chromosoma*, 47: 157–167.
- Miloshev G., Peycheva E., Alexandrova R., 2014. Application of the yeast comet assay in testing of food additives for genotoxicity. *LWT - Food Science and Technology*, 59: 510–517.
- Mohammed K. P., Aarey A., Tamkeen S., Jahan P., 2015. Forskolin: Genotoxicity assessment in *Allium cepa*. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 777 (1): 29–32.
- Monder C., Rusoff I. I., Baldwin R. R., Domingues F. J., Ohan W. J., Thiessen R., 1960. Intermediary Metabolism of Adipic Acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2: 316–330.
- Neutec İlaç. 2017. Codefen. 20 Kasım 2017. <http://pdf.ilacprospektusu.com/4257-codefen-50-50mg-efervesan-tablet-kt.pdf>
- Nunes R. D. M., Sales I. M. S., Silva S. I. O., Sousa J. M. C., Peron A. P., 2017. Antiproliferative and genotoxic effects of nature identical and artificial synthetic food additives of aroma and flavor. *Brazilian Journal of Biology*, 77 (1): 150-154.
- OECD. 2004. Adipic Acid. 15 Ekim 2017. http://webnet.oecd.org/hpv/ui/SIDS_Details.aspx?id=aeeda11e-2c89-4f55-bb70-93cc3e20f66d
- Okorie A., Moramang S., Rants'o T., Magama S., 2017. Modulation of mutagen-induced genotoxicity by vitamin C and medicinal plants in *Allium cepa* L. *Caryologia*, 70 (2): 151–165.

- Pandey H., Kumar V., Roy B. K., 2014. Assessment of genotoxicity of some common food preservatives using *Allium cepa* L. as a test plant. *Toxicology Reports*, 1: 300–308.
- Pereira B. B., Cunha P. B. da, Silva G. G., Campos Júnior E. de O., Morelli S., Filho C. A. V., Lima E. A. de P., Barrozo M. A. S., 2017. Integrated monitoring for environmental health impact assessment related to the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (3): 2572–2577.
- Peron A. P., Bezerra M. De S., Malaquias G. De S., Castro E Sousa J. M. de., 2016. Cytotoxic and genotoxic potential of powdered juices. *Food Science and Technology (Campinas)*, 36 (1): 49–55.
- Pesnya D. S., Romanovsky A. V., Serov D. A., Poddubnaya N. Y., 2017. Genotoxic effects of *Heracleum sosnowskyi* in the *Allium cepa* test. *Caryologia*, 70 (1): 55–61.
- Picataggio S., Beardslee T., 2012. Biological methods for preparing adipic acid, US Patent. Us 2012/0021474a1.
- Priva M. J., Simmon V. F., Mortelmans K. E., 1991. Bacterial mutagenicity testing of 49 food ingredients gives very few positive results. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260 (4): 321–329.
- Pubchem Open Chemistry Database. 2017. Adipik Asit - CID 196. Pubchem. 30 Ekim 2017. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/196#section=Top>
- Rahman M. M., Rahman M. F., Nasirujjaman K., 2017. A study on genotoxicity of textile dyeing industry effluents from Rajshahi, Bangladesh, by the *Allium cepa* test. *Chemistry and Ecology*, 33 (5): 434–446.
- Rambo C. L., Zanotelli P., Dalegrave D., De Nez D., Szczepanik J., Carazek F., Franscescon F., Rosemberg D. B., Siebel A. M., Magro J. D., 2017. Hydropower reservoirs: cytotoxic and genotoxic assessment using the *Allium cepa* root model. *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (9): 8759–8768.
- Ramel C., Magbusson J., 1979. Chemical Induction of Nondisjunction in *Drosophila*. *Environmental Health Perspectives*, 31: 59–66.
- Ramesh A., 2015. Karyotypic analysis in three species of *Allium* and their some Varieties. *International Research Journal of Biological Sciences*, 4 (9): 1–9.

- Rencüzoğulları E., 2014. The Cytogenetic Effects of Sodium Metabisulfite, a Food Preservative in Root Tip Cells of *Allium cepa* L. Turkish Journal of Biology. Tübitak, 25 (2001): 361-370.
- Santos A. P. M., Segura-Munoz S. I., Nadal M., Schuhmacher M., Domingo J. L., Martinez C. A., Magosso Takayanagui A. M., 2015. Traffic-related air pollution biomonitoring with *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom in Brazil. Environmental Monitoring and Assessment, 187 (2).
- Schneiderman M. H., Dewey W. C., Highfield D. P., 1971. Inhibition of DNA synthesis in synchronized Chinese hamster cells treated in G1 with cycloheximide. Experimental Cell Research, 67 (1): 147–155.
- Seward J. R., Schultz T. W., 1999. QSAR Analyses of the Toxicity of Aliphatic Carboxylic Acids and Salts to *Tetrahymena Pyriformis*. SAR and QSAR in Environmental Research, 10 (2014): 557–567.
- Sotto A. Di, Maffei F., Hrelia P., Giacomo S. Di, Pagano E., Borrelli F., Mazzanti G., 2014. Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 68 (1): 16–22.
- Sousa Sales I. M., Barbosa J. S., Karollyne F., Cavalcanti F., Michel P., Ferreira P., 2017. Assessment of Grape , Plum and Orange Synthetic Food Flavourings Using in vivo Acute Toxicity Tests, 55 (1): 131–137.
- Souza R. B. de, Souza C. P. de, Bueno O. C., Fontanetti C. S., 2017. Genotoxicity evaluation of two metallic-insecticides using *Allium cepa* and *Tradescantia pallida*: A new alternative against leaf-cutting ants. Chemosphere, 168: 1093–1099.
- Sposito J. C. V., Crispim B. A., Roman A. Í., Mussury R. M., Pereira J. G., Seno L. O., Grisolia A. B., 2017. Evaluation the urban atmospheric conditions in different cities using comet and micronuclei assay in *Tradescantia pallida*. Chemosphere, 175: 108–113.
- Sun Q., Yang H., Tang P., Lü J., Wang W., Li H., 2018. Interactions of cinnamaldehyde and its metabolite cinnamic acid with human serum albumin and interference of other food additives. Food Chemistry, 243: 74–81.
- Şanlı Y., Yarsan E., Özdemir M., Sekkin S., 1996. Tüketime Sunulan Bazı Tavuk Etlerinde Uçucu Zehirlerin Bulaşma Olgusu. Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi,

43: 109–112.

T. C. Milli Eğitim Bakanlığı. 2011. *Tradescantia* Yetiştiriciliği. Bahçecilik. 7 Kasım 2017.
[http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Tradescanthia
Yetiştiriciliği.pdf](http://www.megep.meb.gov.tr/mte_program_modul/moduller_pdf/Tradescanthia_Yetiştiriciliği.pdf)

Tsuchiya T., Nakamura C., 1979. Acetocarmine Squash Method For Observing Sugar Beet Chromosomes. *Euphytica*, 28: 249–256.

Takagi A., Sai K., Umemura T., Hasegawa R., Kurokawa Y., 1990. Significant increase of 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA of rats following short-term exposure to the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and di(2-ethylhexyl)adipate. Tokyo.
<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~8pYIcJ:96>

The Chemical Company. 2017. Adipik Asit. 29 Kasım 2017.
<https://thechemco.com/chemical/adipic-acid/>

Türkoğlu Ş., 2007. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 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.

Van 't Hof J., 1968. The Action of IAA and Kinetin on the Mitotic Cycle of Proliferative and Stationary Phase Exised Root Meristems. *Experimental Cell Research*, 51: 167–176.

Vardon D. R., Franden M. A., Johnson C. W., Karp E. M., Guarnieri M. T., Linger J. G., Salm M. J., Strathmann T. J., Beckham G. T., 2015. Adipic acid production from lignin. *Energy Environmental Science*, 8 (2): 617–628.

Vicedo B., De La O Leyva M., Flors V., Finiti I., Del Amo G., Walters D., Real M. D., Garcia-Agustin P., Gonzalez-Bosch C., 2006. Control of the phytopathogen *Botrytis cinerea* using adipic acid monoethyl ester. *Archives of Microbiology*, 184: 316–326.

WHO, FAO. 1967. *FAO Beslenme Toplantıları*. 10 Eylül 2017.
<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/40abcj38.htm>

Wilkins A. L., Lu Y., Tan S. T., 1995. Extractives from New Zealand honeys. 5. Aliphatic

dicarboxylic acids in New Zealand rewarewa (*Knigthea excelsa*) honey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 7 (4): 3021–3025.

World Health Organization., 2016. What is JECFA? FAO/WHO Joint Secretariat to JECFA, 1–4. <http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/publications%3E>.

Yavuz-Kocaman A., Kılıç E. 2017. Evaluation of the genotoxicity of commercial formulations of ethephon and ethephon+cyclanilide on *Allium cepa* L. root meristematic cells. Caryologia, 1–9.

Yılmaz S., Ünal F., Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., 2014. DNA damage in human lymphocytes exposed to four food additives in vitro. Toxicology and Industrial Health, 30 (10): 926–937.

Yurttagül M., Ayaz A. 2008. Katkı Maddeleri : Doğrular ve Yanlışlar. Ankara. (1. bs.). T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel M¼d¼rl¼ę¼ Beslenme ve Fiziksel Aktiviteler Daire Başkanlığı, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatma Çisem KARABIYIK

Doğum Yeri : Fatih/ İSTANBUL

Doğum Tarihi : 24.01.1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Fen-Edebiyat
Fakültesi – Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi – Fen
Bilimleri Enstitüsü – Biyoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

Karabıyık F.Ç., Akı C., “Adipik Asitin Genotoksik Etkilerinin *Allium cepa* L. Kök Ucu Hücre Testi İle Belirlenmesi”, Trakya Üniversitelet Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, EDİRNE, TÜRKİYE, 15-16 Mayıs 2017, ss. 76

Çördük, N., Yücel, G., Akıncı, N., Karabıyık, F.Ç., Tuna, M., Esen, O., “Nüclear DNA content and chromosome number analyses in *Silene bolanthoides* Quezel, Contandr. & Pamukç., an endangered endemic species in flora of Turkey”, International Symposium on Biodiversity and Edible Wild Species, ANTALYA, TURKEY, 3-5 April 2017, ss. 154

Karabıyık F.Ç., Bayat H., Duran N., "Toplumsal Pestisit Bilgi ve Duyarlılığının Çanakkale İlinde Anket Çalışmasıyla Belirlenmesi" 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, TRABZON, TÜRKİYE, 1-5 Eylül 2014, ss. 91

Bayat H., Duran N., Karabıyık F.Ç., "Fosetil Alüminyumun Genotoksik Etkisinin *Allium cepa* Testi ile Değerlendirilmesi" 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, TRABZON, TÜRKİYE, 1-5 Eylül 2014, ss. 75

Duran N., Bayat H., Karabıyık F.Ç., "Fosetil Alüminyumun Sitotoksik Etkisinin *Allium cepa* Testi ile Değerlendirilmesi" 21. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, TRABZON, TÜRKİYE, 1-5 Eylül 2014, ss.

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl : Medicalpark Hastaneler Grubu (Anestezi Teknisyeni) - 2015

İLETİŞİM

E-posta Adresi : fcisemkarabiyik@gmail.com