

**PARABEN VE TÜREVLERİNİN
İNSAN LENFOSİT
DNA'SI ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK
ETKİLERİNİN
RAPD-PCR VE COMET TEKNİKLERİ
İLE ARAŞTIRILMASI**

Gölsüm Handan Sinan

Eskişehir, 2017

**PARABEN VE TÜREVLERİNİN İNSAN
LENFOSİT DNA'SI ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN RAPD-PCR
VE COMET TEKNİKLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Gölsüm Handan SİNAN

Doktora Tezi

Danışman: Doç. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü**

Mayıs, 2017

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gölsüm Handan Sinan'ın "Paraben ve Türevlerinin İnsan Lenfosit DNA'sı Üzerindeki Genotoksik Etkilerinin RAPD-PCR ve COMET Teknikleri ile Araştırılması" başlıklı tezi 24.05.2017 tarihinde aşğıdaki jüri tarafından değeriendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğı"nin ilgili maddeleri uyarınca Biyoloji Anabilim Dalında Doktora Yeterlik tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Berrin A. Tüylü	
Üye	: Prof. Dr. Mediha Canbek	
Üye	: Prof. Dr. A. Tansu Koparal	
Üye	: Doç. Dr. Rana Arslan	
Üye	: Doç. Dr. Mustafa Uyanoğlu	

.....
Enstitü Müdürü

ÖZET

PARABEN VE TÜREVLERİNİN İNSAN LENFOSİT DNA'SI ÜZERİNDEKİ GENOTOKSİK ETKİLERİNİN RAPD-PCR VE COMET TEKNİKLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Gülsüm Handan SİNAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, 2017

Danışman: Doç.Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

Paraben ve esterleri ilaç, gıda, bakım ve kozmetik ürünlerinde sıklıkla kullanılan koruyucu katkı maddeleridir. Genel olarak güvenli kabul edilen ancak çok düşük seviyede östrojenik etkiye sahip parabenlerin malign meme tumoründe metabolize edilmemiş halde tespit edilmesi bu maddelerin karsinogenik potansiyellerinin yeniden değerlendirilmesi gereğini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışmasında paraben ve esterlerinin (metil, etil, propil, izopropil, butil, izobütil) insan lenfosit hücrelerinin DNA'sı üzerindeki genotoksik etkileri RAPD-PCR ve Comet teknikleri ile araştırılmıştır.

RAPD yönteminde lenfosit kültüründe 24 ve 48 saatlik uygulamalarda parabenin 500, 250, 100 ve 50 µg/ml ve paraben esterlerinin 100, 50, 25 ve 10 µg/ml'lik dozları kullanılmıştır. PCR'lar 10 nükleotitlik 3 rastgele primerle yapılmıştır. Paraben esterlerine maruz kalan grupların RAPD profillerinde kontrole göre polimorfik bantlar oluştuğu yani bu maddelerin genomik stabiliteyi etkileyebilme potansiyelleri olduğu tespit edilmiştir. Oluşan genomik instabilite yüzdesinin doz ve maruziyet süresi ile ilişkisini hesaplayabilmek için daha fazla primerle daha fazla çalışma yapılması önerilmektedir.

Comet testi için izole lenfositler 1 saat süre ile parabenin 1000, 750, 500 ve 250 µg/ml'lik; metil parabenin 750, 500, 250 ve 125 µg/ml'lik; etil parabenin 500, 250, 125 ve 50 µg/ml'lik; propil ve isopropil parabenin 250, 125, 50 ve 25 µg/ml'lik; butil ve izobütil parabenin ise 125, 50, 25 ve 10 µg/ml'lik dozlarına maruz bırakılmıştır. Comet testinde comet kuyruk uzunluğunun doza ve alkil zincir uzunluğuna bağlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: İnsan lenfositleri, Parabenler, Comet testi, RAPD-PCR.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF PARABEN AND DERIVATIVES ON HUMAN LYMPHOCYTE DNA WITH RAPD-PCR AND COMET TECHNIQUES

Gölsüm Handan SİNAN

**Institute of Science and Technology
Department of Biology
Anadolu University, 2017**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ

Paraben and paraben esters (methyl, ethyl, propyl, isopropyl, buthyl, isobuthyl) are the additives frequently used in pharmaceuticals, foods, personal care cosmetics. Detection of intact parabens which are generally regarded as safe but have weak oestrogenic effect, in the breast tumor necessitates the reassessment of the carcinogenic potential of these substances.

In this study, genotoxic effects of paraben and esters (methyl, ethyl, propyl, isopropyl, buthyl, isobuthyl) of it, frequently used in foods, personal care cosmetics and pharmaceuticals have been investigated in human peripheral blood lymphocytes by using RAPD-PCR and comet assay.

In lymphocytes culture for 24 h and 48 h treatment periods 500, 250, 100 ve 50 µg/ml concentrations of paraben and 100, 50, 25 ve 10 µg/ml concentrations of paraben esters were used in RAPD technique. 3 random primers consisted of 10-mer were used in PCRs. Polymorphic bants have occured compared with control bands in RAPD profiles of the cells treated with paraben esters. Thus, it has been determined that these chemicals have potential for affecting genomic stability. But it is recommended that more studies be conducted with more primers to calculate the relationship between the percentage of genomic instability and the exposure doses and durations.

In comet assay for 1 hour treatment period 1000, 750, 500 ve 250µg/ml concentrations of paraben; 750, 500, 250 ve 125 µg/ml concentrations of methyl p.; 500, 250, 125 ve 50 µg/ml concentrations of ethyl p.; 250, 125, 50 ve 25 µg/ml concentrations of propyl and isopropyl p.; 50, 25 ve 10 µg/ml concentrations of buthyl and isobuthyl paraben were used. Compared to controls, the comet tail length of treated groups significantly increased with dose and alkyl chain length of parabens used.

Keywords: Human lymphocytes, Parabens, Comet assay, RAPD-PCR.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanma ve uygulama aşamasında bilimsel katkı, öneri ve desteklerini tüm anlayışı ve sevgisiyle paylaşan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Berrin Ayaz Tüylü'ye,

Deneylerde laboratuvar olanaklarını esirgemeyen, katkı ve önerileri ile destek olan Sayın Doç. Dr. Emel Sözen'e,

Birlikte yaptığımız beyin fırtınaları ile tezin gerçekleşmesinde, tüm süreçte maddi manevi tüm desteğini sunan sevgili Dr. Devrim Güzel Bayülken'e,

Onsuz bu çalışma olamazdı diyebileceğim tüm özverisiyle desteğini esirgemeyen Murat Kaya'ya,

Zorlu deney çalışmalarında değerli zamanını ve emeğini esirgemeyen Dr. Muhip Hiloğlu'na,

En ümitsiz anların kurtarıcısı laboratuvarın gülün yüzü Müslime Yavuz'a,

Laboratuvarda çalışmayı keyifli hale getiren dostlar Merve Şahiner Kılıç'a, Emine Erdağ'a, Reyhan Varol'a, Hatice Genç'e,

Tüm doktora yaşamım boyunca en büyük desteklerimden biri canım kardeşim Yard. Doç. Dr. Hülya Karaca Genç'e,

Ve en önemlisi, çalışmayı kendilerine adadığım çok sevgili aileme ve eşime

Sonsuz teşekkürler...

Gülsüm Handan Sinan

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Gülsüm Handan Sinan

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Parabenler	4
1.1.1. Absorbsiyon / metabolizma.....	6
1.1.2. Parabenlerle ilgili toksikolojik araştırmalar	10
1.1.3. Parabenlerin genotoksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar.....	13
1.2. Çalışmada Kullanılan Genotoksisite Testleri	15
1.2.1. Comet testi	15
1.2.1.1. Comet yöntemi ile yapılan çalışmalar.....	19
1.2.2. RAPD-PCR yöntemi	24
1.2.2.1. RADP-PCR yöntemi aşamaları.....	25
1.2.2.2. RAPD-PCR yöntemi ile yapılan genotoksisite çalışmaları	29
2. MATERYAL METOD	35
2.1. Materyal	35
2.1.1. Kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar.....	35
2.1.2. Comet testinde kullanılan solüsyonlar	38
2.1.3. RAPD-PCR yönteminde kullanılan solüsyonlar.....	39
2.2. Metod.....	39
2.2.1. Kan örneklerinin alınması	39
2.2.2. Comet testi	39

2.2.2.1. Lenfosit izolasyonu, madde uygulaması ve doz taraması	40
2.2.2.2. Tripan mavisi ile canlılık testi.....	41
2.2.2.3. İzole lenfositlerde comet yöntemi uygulaması	41
2.2.2.4. İstatistik	42
2.2.3. RAPD- PCR yöntemi	42
2.2.3.1. Lenfosit kültürü ve madde uygulaması	42
2.2.3.2. Lenfosit kültüründeki besi yerinin uzaklaştırılması	43
2.2.3.3. Lenfositlerden DNA izolasyonu	43
2.2.3.4. DNA konsantrasyon ve kalite tayini	43
2.2.3.5. RAPD-PCR reaksiyonu.....	44
2.2.3.6. Agaroz jel elektroforezi.....	44
2.2.3.7. PCR ürünlerinin jelde görüntülenmesi.....	45
2.2.3.8. Elde edilen RAPD profillerinin değerlendirilmesi.....	45
3. BULGULAR	46
3.1. Comet Testi Sonuçları	46
3.2. RAPD-PCR.....	48
3.2.1. Paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	49
3.2.2. Metil paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	52
3.2.3. Etil paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	55
3.2.4. Propil paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	58
3.2.5. İsopropil paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	61
3.2.6. Bütil paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	61
3.2.7. İsobütil paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları.....	67
4. TARTIŞMA SONUÇ	71
KAYNAKÇA.....	76

EK
ÖZGEÇMİŞ

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.	Görsel skorlama tekniği ile DNA'ların hasar derecesine göre sınıflandırılması	17
Şekil 2.2.	Etil paraben (Ethyl 4-hydroxybenzoate)	36
Şekil 2.3.	Metil paraben(Methyl 4-hydroxybenzoate)	36
Şekil 2.4.	Propil paraben (Propyl 4-hydroxybenzoate)	37
Şekil 2.5.	İzopropil paraben (Isopropyl 4-hydroxybenzoate)	37
Şekil 2.6.	Bütilparaben (Butyl 4-hydroxybenzoate)	37
Şekil 2.7.	İzobütil paraben (Isobutyl 4-hydroxybenzoate)	38
Şekil 3.1.	24 ve 48 saatlik paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	50
Şekil 3.2.	24 ve 48 saatlik Metil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	53
Şekil 3.3.	24 ve 48 saatlik Etil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	56
Şekil 3.4.	24 ve 48 saatlik Propil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	59
Şekil 3.5.	24 ve 48 saatlik İzopropil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	62
Şekil 3.6.	24 ve 48 saatlik Bütil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	65
Şekil 3.7.	24 ve 48 saatlik İzobütil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri	68

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1.	PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri, G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklıkları	35
Tablo 2.2.	Uygulanan PCR Programı	44
Tablo 3.1.	Test maddelerinin Comet testinde uygulanacak dozları	46
Tablo 3.2.	Parben ve türevlerine 1 saatlik maruziyet sonucunda insan lenfositlerinde oluşan ortalama kuyruk uzunluğu.....	47
Tablo 3.3.	PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri, G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklıkla	49
Tablo 3.4.	İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve Paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları.....	51
Tablo 3.5.	İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve Metil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları.....	54
Tablo 3.6.	İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve etil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları.....	57
Tablo 3.7.	İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve Propil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları.....	60
Tablo 3.8.	İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve İzopropil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları	63

Tablo 3.9.. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve Bütil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları.....	66
Tablo 3.10. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve İzobütil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları.....	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DMSO	: Dimetilsülfoksit
EMS	: Etil methan sülfanat
EDTA	: Etilen daimin tetra asedik asid
SCE	: Kardeş kromatid değişimi
CA	: Kromozom aberasyonu
MN	: Mikronükleus
FISH	: Fluorescent In Situ Hibridization
SMART	: Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
PCR	: Polimolimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
pHBA	: para-hidroksibenzoik asit
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
ng	: Nanogram
FDA	: Food and Drug Administration
ADI	: Acceptable Daily Intake (Kabul edilebilir günlük alım miktarı)
LD₅₀	: %50 Letal Doz

1. GİRİŞ

Gelişen kimya endüstrisi ile birlikte yaşamı kolaylaştırmak ve tüketim ürünlerinin cazibesini artırmak amacıyla üretilen kimyasal madde miktarı her geçen gün artmaktadır. İnsanlar günlük hayatlarında çevresel ve/veya mesleki olarak farklı yollar (oral, temas ve soluma gibi) ve çeşitli ürünler ile (gıda, kozmetik, bakım, temizlik ürünleri ve ilaçlardaki katkı maddeleri gibi) doğrudan; madencilik ve ulaşım gibi faaliyetler sonucunda da dolaylı olarak binlerce kimyasala maruz kalmaktadır.

Yaşam kalitesini artırmak, artan dünya nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamak ve hızlanan yaşam koşullarına pratik çözümler sunmak gibi iyi amaçlara hizmet için bile olsa yoğun ve bilinçsiz kimyasal kullanımı ekosistemin bütün öğelerini olumsuz olarak etkileyebilmektedir. İkinci dünya savaşı sonrasında artan dünya nüfusunun beslenme ihtiyaçlarını karşılamak üzere yoğun pestisit ve kimyasal gübre kullanımı ile tarımsal üretimin artırıldığı hatta bu uygulamaların yeşil devrim olarak adlandırıldığı süreç buna iyi bir örnektir. Az alanda çok ve iyi ürün üretimi ile tarımda verimlilik arttırılmıştır. Ancak zamanla yoğun ve bilinçsiz kimyasal kullanımının toprak ve su kaynaklarını kirlettiği, ekosistemler ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkiler oluşturduğu tespit edilmiştir. Artan DDT kullanım ile azalan yırtıcı kuş popülasyonu arasındaki ilişki gözlemlenen ve daha sonra yapılan bilimsel araştırmalarla belirlenen ilk çevresel etkidir (Carson, 2004). Sucul organizmalar üzerinde yapılan ekotoksikolojik araştırmalarda yarılanma ömrü uzun pestisitlerin yoğun biyobirikim ile beslenme zincirindeki tüm organizmaları etkilediği ve sucul organizmalar için de toksik etkileri olduğu tespit edilmiştir. Halk sağlığı açısından değerlendirildiğinde pestisitlerin sinir ve sindirim sistemi üzerinde toksik etkileri olduğu, pek çok sentetik pestisitın genotoksik etkileri olduğu da yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (Kamel ve Hoppin, 2004; TenBrook vd. 2009).

Sağlık Bakanlığı tarafından çıkarılan ‘Çevresel Etkenlere Bağlı Ortaya Çıkan Hastalıklar’ adlı kitapta çevresel kimyasalların (pestisitler, halojenli endüstriyel kimyasallar, ağır metaller, organik çözücüler gibi) sinir, sindirim, bağışıklık ve üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri ile bazı hastalıkların oluşum süreçlerindeki rolleri bildirilmiştir. Nörolojik ve nörodavranışsal hastalıklar; deri; akciğer; kardiyovasküler hastalıklar; sindirim sistemi hastalıkları; karaciğer hastalıkları ve infertilite gibi hastalıklarda çevresel ve/veya mesleki olarak maruz kalınan kimyasalların çeşitli şekillerde etkili olduğu bildirilmiştir. Bu kimyallardan bazıları bahsi geçen hastalıkların

oluşumunda bizzat etkili iken bazıları hastalığa genetik yatkınlığı olan kişilerde hastalığı tetikleyicidir. Bazı kimyasalların ise hastalığın prognozunu kötüye gitmesinde etkili olduğu bildirilmiştir. Kitapta yapılan literatür araştırmasında maruz kalınan kimyasallar ve sağlığa etkileri genel olarak şu şekilde özetlenebilir. Kurşunun kafa içi basıncını artırdığı; arsenik, karbondisülfür, kurşun ve manganezin bellek zayıflamasına; organotin bileşiklerinin paraplejiye, karbondisülfür, manganez ve toluenin akut psikoz ve ileri derecede duygusal instabiliteye; arseniğin duyuşal gerilemeye, fosfor ve poliklorin bifenillerin yüksek dozlarının hepatik nekroza; kurşun, bakır, formaldehitin hemolitik anemiye yol açtığı bildirilmiştir (Güler, 1994).

Kimyasalların genetik materyal üzerinde meydana getirdikleri etkiler genotoksik etkiler olarak tanımlanır. Kromozom anormallikleri, gen mutasyonları, DNA zincir kırıkları gibi hasarları kapsayan bu etkiler yaşlanma, infertilite ve bazı multifaktöriyel hastalıklara yol açmaktadır. Nörodejeneratif bozukluklar olarak tanımlanan Parkinson ve Alzheimer (Jeppesen vd., 2011); konjenital bir anomali olan nöral tüp defekti (Aravinthan vd., 2012); tip 2 diyabet (Blasiak vd., 2004, El-Wassef vd., 2012) ve kanser (Slyskova vd., 2014) etiolojisinde DNA hasarı olan bazı hastalıklardır.

Kanser, bu hastalıklar arasında dünyada ve ülkemizde sebebi bilinen ölümler sıralamasında kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada yer alması ve hastalarda artışın devam etmesi sebebiyle üzerinde özellikle durulması gereken bir hastalıktır. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu tarafından yapılan Ulusal Kontrol Planında (2013-2018) kanser artışının benzer seviyede devam etmesi halinde 2030 yılına gelindiğinde yıllık 22 milyon yeni vakanın ortaya çıkması beklendiği bildirilmiştir. Sık rastlanan ve görülme sıklığı zaman içinde hızla artmakta olan bu hastalığın tam ve etkin kontrolü ancak dinamik, çok yönlü, multidisipliner bilimsel araştırma ve uygulamalarla mümkün olabilecektir (Türkiye Kanser Kontrol Planı, 2013).

Kimyasal maddelerin genotoksik etkileri ile karsinojenik potansiyelleri arasında ilişki pek çok çalışmada incelenmiş, karsinojen olan pek çok bileşiğin genotoksik olduğu bulunmuştur. Kanser risklerinin değerlendirmeleri açısından ilaçlar; ilaç, gıda ve kozmetikte kullanılan katkı maddeleri ve endüstriyel kimyasalların insan sağlığı açısından mutajenik ve karsinojenik etkilerinin araştırılması önem kazanmıştır (Collins, 2014).

Mutasyonlar, kromozomal anormallikler, DNA zincir kırıkları gibi DNA hasarları ve genomik kararsızlık genotoksisite değerlendirmesinde kullanılan biyobelirteçlerdir. Kimyasalların genotoksisite potansiyellerini ve etki mekanizmalarını araştırmak amacıyla çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri geliştirilmiştir. Farklı hasar tiplerini ve hasar düzeylerini belirlemede faydalı olan bu yöntemler genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kansere duyarlılığın tayininde ve takibinin yapılmasında biyoizlem testleri olarak da kullanılmaktadır (Şekeroğlu Z. ve Şekeroğlu V., 2011). Genotoksisite tespitinde bir testin tek başına yeterli olmadığı, en az iki test olmak üzere bir seri test sisteminin kullanılmasının daha faydalı olacağı bildirilmiştir (Kramer, 1998).

Sıklıkla kullanılan genotoksisite testleri *Salmonella* testi (Ames testi), mikronükleus testi (MN), kardeş kromatid değişimi testi (KKD), kromozom anormallığı testi, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), comet ve RAPD-PCR yöntemleridir.

Bu çalışmada genotoksisitesi değerlendirilen paraben ve türevleri etkili antimikrobiyal aktiviteleri ile geniş ürün yelpazesinde sık tercih edilen koruyucu katkı maddeleridir (Soni vd., 2005). Katkı maddeleri ürünlerin renk, koku ve yapılarının bozulmadan raf ömürlerini uzatmak, niteliklerini korumak amacıyla eklenen maddelerdir. Bu tanım ilaç, gıda ve kozmetik ürünlerinde kullanılan katkı maddeleri için geçerli bir tanımdır. Gıda ve kozmetik ürün formülasyonları, içerdikleri mineraller, uygun ortam asitliği ve nemi ile mikroorganizma üremesi için uygun ortamlardır. Kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanılan katkı maddelerinin bir sınıfı olan koruyucular, mikroorganizmaların neden olabileceği bozulmalardan ürünleri koruyarak ürünlerin raf ömrünü uzatan kimyasallardır (Çalışır ve Çalışkan, 2003).

Hazır paketli tüketim ürünlerinin hemen hepsinde kullanılan katkı maddelerinin gündelik yaşamda maruz kalınan kimyasal miktarını artırması bu maddelerin insan sağlığına olası zararlı etkileri hususundaki endişeleri de beraberinde getirmektedir. Katkı maddelerinin güvenli kullanımı için çalışan uluslararası kuruluşlar katkı maddeleri üretim ve kullanımı ile standartlar oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalardan elde edilen bilimsel verileri ışığında ADI (kabul edilebilir günlük alım miktarı) değerleri belirlenerek katkı maddelerinin kontrol altında kullanılmasıyla ilgili yasalara referans olunmaktadır (Mpountoukas vd., 2008).

Ürünlerin raf ömrünü uzatarak mikroorganizma kontaminasyonunu engellemek için uzun yıllardır güvenle kullanılan paraben ve türevleriyle ilgili son yıllardaki araştırma ve tartışmalar parabenlerin güvenilirlik açısından yeniden değerlendirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Parabenlerin östrojenik etkisiyle ilgili kaygılar ile bazı ülkelerde kullanımına sınırlama getirilmiştir. Örneğin Danimarka'da 3 yaş altı bebek ürünlerinde paraben kullanımı yasaklanmıştır (SCCS, 2011). İnsanların maruz kaldığı paraben miktarlarının ölçüldüğü çalışmalarda paraben maruziyetinin arttığı yönünde sonuçlar elde edilmiştir (Pycke vd., 2015). Tüm katkı maddeleri gibi özellikle son dönemde yaşanan tartışmalarla daha da popüler olan parabenlerle ilgili kafa karışıklığı sürmekte iken bu bileşiklerin kanser oluşum süreci ile yakından ilişkili genotoksik etkilerinin de iyi değerlendirilmesi gerekmektedir. Parabenlerin çeşitli yöntemlerle genotoksisite potansiyellerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmakta ve bu çalışmalarda da son cümle olarak bu bileşiklerin farklı hücre kültürleri ve yöntemlerle daha detaylı araştırılması tavsiye edilmektedir.

Araştırmalarımıza göre parabenlerin insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri comet ve RAPD yöntemleri ile çalışılmamıştır. Bu çalışmada sık kullanılan paraben ve türevlerinin (metilparaben, etilparaben, propilparaben, butilparaben, isopropilparaben, isobutilparaben) insan lenfosit hücrelerinde genotoksik etkilerinin comet ve RAPD-PCR yöntemleri ile değerlendirilmesi ve sonuçların ilgili makamlarla paylaşarak bu maddelerle ilgili düzenlemelere katkı sunması amaçlanmıştır.

1.1. Parabenler

Parabenler para-hidroksibenzoik asitin esterleridir. Bir asit katalizör varlığında parahidroksibenzoik asitin ilgili alkol (etanol, metanol, bütanol gibi) ile esterleşmesi suretiyle elde edilirler ve ester gruplarına göre (etilparaben, metilparaben, butilparaben gibi) adlandırılırlar. Saf haldeyken genelde renksiz, kokusuz, küçük kristal tozu şeklindedirler (Soni vd., 2005).

Parabenler, membran transportuna ve mitokondriyal fonksiyon sürecine engel olmak suretiyle antimikrobiyal etki gösterirler. Küf, maya ve Gram (+) bakterilere karşı çok etkili iken, Gram (-) bakterilere karşı düşük aktivite göstermektedirler (Itoh vd., 2006).

Piyasada uzun yıllardır işlenmiş pek çok üründe koruyucu katkı maddesi olarak sentetik parabenler kullanılmaktadır. Bunula birlikte paraben ahududu, çilek, böğürtlen ve Frenk üzümü gibi bazı gıdalarda doğal olarak bulunmakta, bazı meyve sularında ve şaraplarda da doğal olarak oluşabilmektedir (Labat vd., 2000).

Parabenler kokusuz ve renksizdir; kullanıldıkları ürünlerde de bu yönde bir değişime sebebiyet vermezler. Kimyasal kararlılığını asidik, nötral ve hafif bazik pH'da ve yüksek sıcaklıkta korumaktadırlar. Güçlü antimikrobiyal etkiye sahip ve düşük maliyetlidirler. Sistemik toksisite bakımından güvenli kabul edilirler. Pareben ve türevleri tüm bu avantajlarıyla kozmetik, ilaç ve gıda sektöründe tercih edilen etkili birer koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar (Soni vd.,2002).

Kozmetik sektöründe kişisel bakım ve temizlik ürünleri dahil (kremler, losyonlar, nemlendiriciler, makyaj ürünleri, diş macunları, saç kremleri, banyo köpüğü, şampuan, ıslak mendiller, deodorant ve roll-on gibi) hemen her tür ürünün içinde paraben ve türevleri bulunmaktadır. Bu ürünlerde en çok tercih edilenler metil ve propil paraben olmakla birlikte diğer esterleri de preparatlarda tek tek ya da karışım olarak kullanılmaktadır. Kullanım sıklığı ile ilgili en çoktan en aza şöyle bir sıralama yapılmıştır; metilparaben, etilparaben, proilparaben, butilparaben ve benzilparaben (Yazar vd., 2011).

Ürünler saç, duduk, yanak mukoza (oral, oküler ve vajinal) ile temas eder. Parabenler pH 4,5-7,5 arasında stabilliğini korur. Yüksek sıcaklıkta da antimikrobiyal aktivitelerini kaybetmediklerinden paraben içeren ürünler güvenle otoklavlanabilir (Itoh vd., 2006).

İlaçlarda tek tek kullanımından ziyada kombinasyonları tercih edilmektedir. İlaçlarda en çok tercih edilen paraben türevi ise propil parabenlerdir. 1990'ların ortalarından itibaren hem her tür formülasyonda (anesteziklerde, haplarda, şuruplarda, enjekte edilen solüsyonlarda) kullanılmaktadır. Kullanılan konsantrasyon ürüne göre değişse de oran nadiren %1'i geçer (Soni vd., 2005). Göz ilaçlarında metil ve propil paraben alerjen olarak tanımlanmış, kullanımına sınırlama getirilmiştir (FDA,1996).

Son 50 yıldan uzun süredir ve artan oranlarda gıdalarda koruyucu katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. İşlenmiş gıdalarda, yağ, şeker, kahve, meyve suları, soslar, hafif alkollü içeceklerde, kek, dondurma, krema, reçel, jöle, şurup ve dondurulmuş gıdalarda; 450 ile 2000 ppm arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Gıda sektöründe daha çok metil ve propil paraben tercih edilmektedir (Wang vd., 2006).

Parabenlerin sudaki çözünürlüğü ester grubundaki karbon sayısı ile ters orantılıdır. Antifungal etkisi alkil zincirinin uzunluğu ile doğru orantılıdır. Ancak zincir uzunluğu çözünürlüğü azalttığı için ürünlerde daha ziyade kısa zincirli esterler tercih edilmektedir. Parahidroksibenzoik asit esterlerinin karışım halinde kullanılması durumunda karışımdaki esterlerin tek tek kullanımına kıyasla daha fazla koruyucu etki elde edilir. (Sasseville, 2004; Cashman vd., 2005).

Maruz kalınan paraben miktarı yaş gruplarına ve yaşam şekillerine göre değişiklik gösterecektir ancak; doğal kaynakların yanında tüketilen pek çok işlenmiş gıda ürünü, ilaçlar ve kozmetik bakım- temizlik ürünleriyle birlikte günlük paraben maruziyetinden bahsedilebilir.

Gıda Katılarında FAO/WHO Uzmanlarından Oluşan Komite JECFA parabenler için ADI değerini; günde vücut ağırlığı başına 0-10 mg/kg vücut ağırlığı/ gün olarak belirlemiştir (Kirchhof vd., 2013).

AB direktifleri (95/2/EC) parabenlerin kozmetik ürünlerde kullanılabilir en yüksek oranını paraben kombinasyonları toplamında %0,8 w/w olarak belirlemiştir. Tek ester içinde bu oran %0,4 w/w'dir. Parabenler hipoalerjenik etiketli ürünlerde bulunabilirler. Parabenlerin kullanımına izin verilen ülkelerde paraben sodyum benzoatlarına da izin verilmiştir. Heptil parabenin 12 ppm'i geçen miktarının hafif içecekler ve meyve içerikli gıdalarda kullanımı FDA tarafında yasaklanmıştır. Parabenler özellikle Gram (+) bakteriler ve bazı Gram (-) bakterilere karşı etkilidir. FDA etil, metil, propil ve butil parabenin sentetik katkı olarak gıda ürünlerinde kullanımına 20 ppm'i aşmayacak miktarlarda izin vermiştir. Parabenlerin direk katkı maddesi olarak kullanımında sınır belirlenmişken, paketlenme aşamasında paket ve kutulardaki kullanımı gibi indirek uygulamalarda sınır koyulmadan izin verilmiştir (SCCS, 2010).

1.1.1. Absorbsiyon / metabolizma

Metil ve propil parabenin sağlığa etkilerinin değerlendirildiği SCOGS (Select Committee on GRAS Substances) raporunda, sığırlarda, tavşanlarda, köpek, kedi ve insanda bu parabenlerin gastrointestinal yolla absorplanıp metabolize edildiği bildirilmiştir. Ne metil ne de propil paraben vücutta birikmez. Tamamı değil ama önemli bir kısmı karaciğer ve böbreklerde metabolize edilir ve idrarla atılır. İdrarla atılan metabolitler; p-hidroksibenzoikasit (pHBA), glisin, glukorinik asit ve pHBA'nın

konjugatlarıdır. Parabenlerin metabolik akıbeti ile ilgili tavşanlara tek doz gavaj yoluyla verilen parabenin (0,4 veya 0,8 mg/kg); %39'u serbest pHBA, %22'si glukoronik asit (%7 ester ve %15 eter olmak üzere), %15'i glisin ve %10'u ise sülfürik asit konjugatları şeklinde atılmıştır. Üriner atılım hızlıdır ve 24 saat içinde parabenin %86'sı temizlenir. Doz arttıkça atılım hızı düşecektir. Ağızdan aynı dozlarda paraben verilen tavşanlarda, 24 saat içinde 0,2 ve 0,9 oranında esterin değişmeden atıldığı gözlemlenmiştir. Parabende alkil zincir uzadıkça pHBA'nın idrarla atılım oranı düşer. Genelde paraben uygulamasından 24 saat sonra parabenin %25-39'u pHBA, %25-29'u glisin konjugatları %10-18'i eter glukorinit, %5-8'i ester glukorinit, %7-12'si sülfat olarak atılır. Başka bir farmokinetik çalışmada köpeklere 50 mg/kg intravenöz olarak; 1 g/kg oral yolla paraben verilmiştir. Paraben ve metabolitlerinin farklı saatlerde kanda ve idrarda miktarları ölçülmüştür. İntravenöz uygulamadan kısa süre sonra kandan ana maddeden çok azı kalmıştır. pHBA kanda enjeksiyondan 6 saat sonra, oral yolla verildikten ise 24 saat sonra tespit edilebilmiştir. 100 mg/kg/gün paraben verilen köpeğin beyin, dalak ve pankreasında saf ester tespit edilmişken, metabolitlerin önemli bir kısmı karaciğer ve böbrektedir. Bir yıllık bir çalışmada yıl boyunca her gün 1 g/kg/gün paraben verilen sıçanlarda yıl sonunda birikmeye dair herhangi bir kanıt bulunamamıştır. Sıçanlarla yapılan başka bir çalışmada, 1000 mg ester oral yolla verilmiştir. Gastrointestinal yoldan hızlıca absorblanan parabenler farklı organlarda esterazlar aracılığı ile pHBA'lara hidrolizlenmiştir. Uygulamadan 30 dakika sonra idrarda paraben metabolitlerine rastlanmıştır. 1,5 saat sonrasında da metabolit atılımı maksimuma ulaşmış ve tekrar düşüşe geçmiştir. Kandaki paraben konsantrasyonu ise oldukça düşüktür (Boberg vd, 2009).

Araştırmacılar paraben detoksifikasyonun iki aşamada olduğunu bildirmiştir.

1. Parabenin hızlı absorblanıp atılımı (idrardan pHBA olarak).
2. Glukorinin, sülfö ve glisin konjugatlarıyla metabolik detoksifikasyonu.

Erkek kedilere işaretli ¹⁴C halkası içeren parabenler oral yolla verilmiş ve 24., 48. ve 72. saatlerde hayvanlardan idrar ve feçes toplanarak analiz yapılmıştır. İki major metabolit; pHBA ve p- hidroksipurik asit'e rastlanmıştır. Ve 24 saat içinde işaretli parabenin %90'ının atıldığı gözlenmiştir. *In vitro* çalışmalar karaciğer ve böbrekteki esterazların paraben hidrolizinde çok etkili olduğunu göstermektedir (Soni vd., 2005).

Yapılan bir çalışmada sıçan hepatositlerinde propil paraben ve esteraz inhibitörü diazinon maruziyetinin hücre ölümünü artırdığı ve hücre ATP ve total adenin

nükleotitinde azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir. Esteraz inhibiötrü varlığında propil parabenin daha fazla toksik etki göstermesi kendisinin metabolitinden daha toksik olduğunun kanıtıdır. Toksik etki bakımından karşılaştırma amacıyla yapılan bir çalışmada bütil ve isobütil parabenin, propil ve isopropil parabene göre daha toksik olduğu; pHBA, etil ve metil parabenin ise propil parabenden daha az toksik olduğu bildirilmiştir. Metabolitler veya propil paraben kaynaklı alkol türevleri ciddi bir toksik etki göstermemektedir. Bu çalışmalar ayrıca, parabenlerin Beta-esteraz grubu hepatik karboksilesterazlarca enzimatik olarak hidroliz edildiklerini göstermektedir (Nakagawa ve Moldues, 1998).

İn vitro çalışmalar parabenlerin hidrolizinde karaciğer ve böbrekteki esterazların çok etkili olduğunu ortaya koymuştur. Bando ve arkadaşları (1997) sıçan derisinde esteraz inhibitörü isoflulorofate varlığında ve yokluğunda paraben uygulaması yapmışlardır. İnhibitör olmadan uygulanan paraben miktarından %30'unun bozulmadan kaldığı, inhibitör varlığında ise paraben miktarında önemli bir düşüş olmadığı tespit edilmiştir.

Gönüllü bir insana 5 gün boyunca gün 2 g propil paraben verilmiş, uygulanan dozun %17,4'ünün pHBA, %13,7'sinin serbest glisin, %3,7'sinin ise glisin konjugatları olarak atıldığı bildirilmiştir. Atılan parabenin %55'i sülfatla konjusedir. İdrarda propil paraben tespit edilmemiştir. Diğer bir çalışmada 6 gönüllüye vücut ağırlıklarına göre 10-20 mg/kg olacak kadar propil paraben verilmiş ve 60., 135., 225. dakikalarda serumlarında analiz yapılmıştır. Ölçümlerde serumlarda pHBA tespit edilmiş ancak esteri bulunmamıştır. pHBA'nın da serumda bulunan maksimum seviyesi 4,5 µg/ml'dir (Soni vd., 2005).

Son dönemde Darbre ve arkadaşları (2004) yaptığı çalışmada meme tümöründe yaygın kullanılan 5 paraben türevini (metil paraben, etil paraben, propil paraben, bütil ve isobütil paraben) metabolize edilmemiş olarak tespit etmişlerdir. Bu bulgu bu kimyasalların kanser oluşum sürecinde direk etkili olduklarını göstermemekle birlikte, özellikle kozmetik sektöründe sıklıkla kullanılan bu kimyasalların vücutta birikebileceğini dolayısıyla güvenlik açısından yeniden değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Çalışma ile ilgili özellikle kozmetik sektörü ile ilişkili çevrelerden çalışmanın kısıtlılığı konusunda eleştiriler gelmiş ve bu arada paraben türevleri ile ilgili yeni çalışmalar yapılmıştır.

Çevresel paraben maruziyetinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda tarım alanlarında, kanalizasyon sularında, nehirlerde ve içme suyu kaynaklarında ve hatta ev tozlarında dahi paraben varlığı tespit edilmiştir. Bu paraben kontaminasyonunda sentetik parabenler dışında doğal üretilen (bazı bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından) parabenlerin de katkısı olduğu hesaba katılmaktadır (Wang vd., 2012; Yamamoto vd., 2011).

İnsan vücuduna parabenler beslenme yoluyla ağızdan ya da kullanılan kozmetik ve bakım ürünleriyle deriden girmektedir. Deri yolula alınan parabenler keratinosit karboksilestrazlar aracılığı ile metabolize edilip idrar ve safra yoluyla atılmaktadır. Ağız ve damar içi uygulamalarla alınan parabenler ise sindirim sistemi ve karaciğer esterazları ile metabolize edilmektedir. Yapılan çalışmalarda metabolize edilmemiş paraben türevleri insan sütünde, ürede, serum ve seminal sıvıda ve meme kanseri hücrelerinde tespit edilmiştir (Frederiksen vd., 2011; Calafat vd., 2010).

Amerika’da yapılan bir çalışmada bir yıl içinde hastaneye verilen 2,548 idrar örneği HPLC yöntemi ile analizlenerek yaygın kullanılan 4 paraben türevi (metil-, etil-, propil- ve bütıl paraben) taraması yapılmıştır. Tarama sonucu idrar örneklerinin %99,1’inde metil paraben; %92,7’inde propil paraben; %42,4’ünde etil ve %47’sinde bütıl paraben tespit edilmiştir. Örneklerde tespit edilen paraben miktarları ile parabenlerin kullanım yaygınlığı arasında bir orantı vardır (Calafat vd., 2010).

Parabenlerin plasentadan geçişinin değerlendirildiği bir çalışmada gebe sıçanlara günlük 100, 200 ve 400 mg/kg dozlarında deri altı enjeksiyonu yoluyla etil ve bütıl paraben uygulanmıştır. Sonra bu maddelerin amniyotik sıvı, fetus ve maternal serumdaki miktarları belirlendiğinde her ikisinin de plasentadan geçtiği; etil parabenin bütıl parabene kıyasla daha fazla oranda bulunduğu belirlenmiştir (Frederiksen vd., 2008).

Shanmugam ve arkadaşlarının (2010), meme kanseri hücrelerinde gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi (GC–MS) kullanarak paraben ve türevlerinin varlığını araştırdığı çalışmada sırayla bütıl paraben, etil paraben, propil paraben ve metil paraben tespit edilmiştir. En yüksek oranda bütıl paraben bulunması bütıl parabenin daha lipofilik bir karakterde oluşu ve metil parabene göre daha az metabolize edilebilmesi ile açıklanmıştır.

Tümör dokularında paraben konsantrasyonu tespitine yönelik bir diğer çalışmada 15 over kanseri 15 de iyi huylu over tümörü dokularından; kanser dokularında daha yüksek oranda paraben (metil ve propil paraben) tespit etmişlerdir (Sajid vd., 2015).

1.1.2. Parabenlerle ilgili toksikolojik araştırmalar

Parabenlerin laboratuvar hayvanlarında düşük akut oral toksisite oluşturduğu rapor edilmiştir. Akut toksiste oluşturma potansiyeli paraben alkil zincir uzunluğu artıkça düşer. Bu düşüş hidroliz zamanının artışıyla bağlantılıdır (Darbre ve Harvey, 2008).

Ölümcül dozlarda ataksi (kas kontrol kaybı), merkezi sinir sisteminin baskılanması ve hızlı ölüm gerçekleşir. Yapılan çalışmalarda karışım haline paraben uygulaması toksisiteyi artırmamıştır yani bu bileşenlerin sinerjistik toksisite oluşturmadığı gözlenmiştir. Minimum letal doz (hayvanların %60-80'ini öldüren doz) 5 g/kg olarak bulunmuştur (Soni vd., 2005).

Faralere intravenöz yolla verilen metil paraben için LD₅₀ 170 mg/kg, propil için LD₅₀ ise 180 mg/kg bulunmuştur. Fareler yaklaşık metil parabenin 80 mg/kg dozunda, propil parabenin ise 50 mg/kg dozunda paraliz olmuştur. Ayrıca parabenlerin kardiyovasküler sistem üzerine etkili iken merkezi sinir sistemi üzerine etkili olmadığı görülmüştür (Soni vd., 2005).

Ito ve Hirose'nin (1987) propil parabenin proliferatif etkisini değerlendirdiği çalışmada 15 hamsterın diyetine %3 oranında (yaklaşık 3 g/kg/gün miktarda- 20 hafta boyunca) propil paraben eklenmiştir. Deney sonunda mikroskopik incelemelerde karın veya karaciğerde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır. Mesane epitelinde lezyon görülmemiş ancak proliferatif işaretleme indeksinde bir artış görülmüştür. Sıçanlarda hücre çoğalmasının artışının göstergesi olan işaretleme indeksindeki artışın olduğu bölge insanlarda bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu sonuçların insanlar üzerine yorumlanması bazı tartışmalara neden olmuştur.

Albino tavşanların tıraşlanan sırt bölgelerine %10 metil veya propil paraben içeren merhemler sürülmüş, 48 saat içinde herhangi bir iritasyon gözlenmemiştir. 48 saat sonunda böbrek dokularına uygulanan ana maddelere rastlanmamıştır. Parabenler çeşitli iritasyon teknikleriyle incelenmiştir. Dilüe edilmemiş metil paraben orta derecede iritasyon oluştururken, belli oranlarda metil paraben içeren formülasyonlar böyle bir

etkiye neden olmamışlardır. Etil paraben iritasyon oluşturmaz. %0,2 propil ve %0,1 bütül paraben içeren ürün 0,1 ml'lik dozda 6 albino tavşanın genital mukozasına tek seferlik uygulanmış, uygulamayı izleyen 7 günlük gözlemlerde herhangi bir iritasyon oluşmadığı bildirilmiştir (Soni vd., 2005).

Kronoik toksisite araştırmasında 50/RC/JCI fareler 102 haftalık %0,15; 0,5; 0,6 butil ve izobütül paraben içeren bir diyetle alınmış, kontrol grubuyla uygulama grubun karşılaştırıldığında karaciğer ve yumuşak dokuda tümör oluşumunda değişim olmadığı tespit edilmiştir. Farelerin gıdalarına katılan izobütül paraben dozları %5 ve %10'lara çıkarılmış ilk iki haftada bu yüksek dozlarda tüm fareler ölmüştür. Histolojik incelemelerde %1,25'ten yüksek doza maruz bırakılan farelerde, dalakta atrofi ve lenf nodları tespit edilmiştir. Bu gruplara çok odaklı dejenerasyon ve hepatik parankimde nekrozlar gözlenirken, %0,6 izobütile maruz kalanlarda önemli bir lezyon oluşmamıştır (Inai vd., 1985).

Göz için olası toksik etkilerin %0,1–0,8 konsantrasyon aralığında paraben içeren ürünlerle araştırılmış, ürünlerin pek çoğu herhangi bir iritasyon oluşturmamışken, birkaçı minimal düzeyde iritasyona sebep olmuştur (Soni vd., 2005).

25 hafta süre ile farelerin besinlerine %0,2, %1 ve %2 oranlarıyla katılan parabenler farelerde mikroskobik veya makroskobik bir değişme neden olmamıştır (Soni vd., 2005).

Bir dermal toksisite çalışmasında 3 ay süreyle her gün %0,2 metil ve propil paraben içeren ürün tavşanların vücut yüzeyinin %10'unu kapsayacak alana sürülmüş ve kalıcı hafif eritem ve orta düzeyde deri dökülmeleri oluşmuştur. Yüksek dozlarda iritasyon artmıştır. Bunu dışında hayvanlarda gıda tüketimi, vücut ağırlığı, hematolojik veya biyokimyasal herhangi bir değişim olmamıştır. Histolojik incelemede doza bağlı olarak ortadan ağıra doğru infiltrasyon gözlenmiştir (Soni vd., 2005).

Sıçanlarla yapılan bir dermal toksisite çalışmasında, 133 hafta boyunca tıraşlanan arka bölgelerine günlük 4,12 g/kg'lık doz uygulaması sonrasında sıçanların vücut ağırlıklarında düşüş gözlemlenmiş ancak bunun dışında başka toksisite belirtisi görülmemiştir (Soni vd., 2005).

Parabenler östrojenik aktiviteye sahip olup östrojen reseptörlerine bağlanma eğilimindedir. Ancak doğal bir östrojen olan 17 β -estradiol ile karşılaştırıldığında bu aktivitenin 1000 ila 1000 000 katı kadar daha düşük olduğu ve alkil zincir uzadıkça östrojenik aktivite potansiyelinin de arttığı bildirilmiştir (Van Meeuwen vd., 2008).

Kronik toksisitenin değerlendirildiği bir çalışmada 24 sıçan 96 hafta; 24 sıçan da 12 hafta boyunca %2 (bu oranın besinlerdeki yaklaşık miktarı; 0,9-1,2 g/kg/gün) ve %8 (bu oranının yaklaşık miktarı ise 5,52 g/kg/gün) metil ve propil paraben içeren gıdalarla beslenmişlerdir. Haftalık değerlendirmede sıçanların gıda tüketiminde herhangi bir azalma gözlemlenmemiştir. Deney sonunda hayvanlar öldürülmüş böbrek, karaciğer, dalak ve pankreas mikroskopik inceleme için çıkarılmıştır. Herhangi bir toksik etkiye rastlanmamış, çalışmada NOEL değeri 5,52 g/kg/gün olarak açıklanmıştır (Soni vd. 2005).

Propil ve bütül parabeninin endokrin bozucu etkilerinin belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmalarda bu maddelere maruz bırakılan erkek sıçanlarda düşük sperm üretimi ve testosteron düzeyi gibi olumsuz üreme etkileri tespit edilmiştir (Oishi, 2002).

Köpeklerle yapılan başka bir çalışmada 0,5 -12 g/kg/gün doz aralığında metil ve propil paraben içeren diyet bir yıl kadar uygulanmış çalışma sonrasında böbrek, karaciğer, dalak ve pankreasta toksik etki gözlemlenmemiştir. Propil paraben 4 g/kg/gün dozunda toksik etki göstermiştir (Soni vd., 2005).

40 sıçan ile 18 aylık bir çalışmada 60'a 40 oranında propil ve etil parabenin sodyum tuzları besinlere katılmıştır. Hayvanların karışımdan aldıkları miktar 0,014 g/kg/gün'dür. Çalışmada uygulama ile birlikte hayvanların vücut ağırlıklarında düşüşten başka olumsuz bir etki bildirilmemiştir (Soni vd., 2005).

Etilparabenin yüksek konsantrasyonunun (%1-2 oranında) *D. melanogaster*'de toksik etki göstererek hayat sürelerini kısalttığı, yumurta verimini düşürdüğü, erginleşebilen birey sayılarını önemli oranda düşürdüğü belirlenmiş, %0,02'lik etilparabenin konsantrasyonun ise östrojenik aktivite göstererek üretkenliği artırdığı bildirilmiştir (Liu vd., 2014).

Parabenelerin endometrium kanserindeki rolünün araştırıldığı tez çalışmasında; endometrium kanserli hastaların kanser dokularında belirlenen paraben konsantrasyonları sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırılınca anlamlı derecede fazla çıktığı tespit edilen esterlerin özellikle uzun alkil zincirli (propil, bütül ve isobütül paraben) paraben esterleri olduğu bildirilmiştir (Doğan, 2016).

1.1.3. Parabenlerin genotoksik etkileri ile ilgili yapılan çalışmalar

S.typhimurium'un TA100, TA98, TA1535 ve TA1537 suşlarıyla metil ve propil parabenin mutajenik potansiyelinin değerlendirilmesi Ames test sistemi ile yapılmıştır. Modifiye bir Ames testinde *S. typhimurium* TA100 ve TA98 suşu ve *E. coli* D-2 suşu kültürlerin DMSO ile birlikte verilen propil parabenin S9 mix varlığında da, yokluğunda da TA100 suşu hariç mutajenik etki göstermediği tespit edilmiştir (Soni, 2002).

Salmonella typhimurium'un TA98 ve TA100 suşları kullanılarak parabenin 5 - 100 µg/plak olma üzere 5 konsantrasyonun mutajen etkisinin AMES S9 (+) ve S9 (-) testi ile değerlendirildiği tez çalışmasında artan paraben konsantrasyonuna paralel olarak mutajenite oranının arttığı tespit edilmiştir (Aydoğan, 2016).

Bacillus subtilis'le yapılan *Rec* deneyinde (indirek DNA hasar ölçümüyle) S9 mix varlığında ve yokluğunda sonuçlar negatifken, *E.coli* ile yapılan *Rec* deneyinde ise sonuç pozitif olmuştur (Morita vd., 1981).

Litton ve arkadaşları 1974'de 3 farklı mutajenite testini konak kullanarak yapmıştır. Konaklı deney 3 aşamadan oluşur; akut *in vivo* test, subkronik test ve bir *in vitro* çalışma. Akut testte; farelere oral yolla 0-5000 mg/kg metil paraben verildikten sonra, farelere intraperitoneal yoldan 2 ml *S. typhimurium* TA1530 suşu ve *S. cerevisiae* D-3 suşu verilmiş, hayvanlar 3 saat sonra öldürülerek, peritoneal sıvı ekstraktı elde edilmiş ve bakteriler sayılarak mutajenite oranına bakılmıştır. Metil parabenin önemli oranda mutajeniteye ve rekombinasyon frekansında artışa sebep olmadığı bildirilmiştir. Subkronik testte 10 fareye 5 gün boyunca 0-3500 mg/kg metil paraben verilir, son uygulamayı takip eden 30 dakika içinde aynı bakteriler aynı yolla farelere verilmiştir. Sonuçta gene kontrole göre önemli oranda mutajenite artışı olmadığı görülmüştür. *In vitro* çalışmada 0-100 µg/ml metil paraben mikroorganizmaların platelerine eklenmiştir. İnkübasyon sonrası mutantlarda kontrole göre artış olmamıştır. Gene Litton ve arkadaşları sıçanlarla yapılan deneyde 5 günlük 0-5000 mg/kg arasında değişen dozlarda paraben uygulamalarında sıçanların kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonu oluşmadığı bildirilmiştir. 5 gün içinde 5000 mg/kg doz alan sıçanların kemik iliği hücrelerinde mitozda düşüş tespit edilmiş ve yüksek dozda subkronik uygulamada metil parabenin mitozu engel olabileceği ileri sürülmüştür (Soni 2005).

CHO'de metil-, etil-, propil- ve bütill parben türevlerinin (24. ve 48. saatlerde) kromozom aberasyon oluşturup oluşturmadığına bakılarak paraben türevleri için tolere

edilir dozları hesaplanmıştır. Maksimum tolere edilebilir dozlar; metil paraben için 0,5 mg/ml, etil paraben için 0,25 mg/ml, propil paraben için 0,125 mg/ml ve bütıl paraben için 0,06 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Metil paraben hariç tüm parabenler poliploid hücre oluşumunu %1- 3 arasında değiştirmiştir. Alkil zincir uzadıkça poliploid hücre oluşum frekansı artmıştır. İncelenen parabenler içine metil ve etil parabenin kontrole göre (%15 ve %11 oranlarında) kromozom aberasyonunu önemli oranda artırdığı görülmüştür (Soni vd, 2002).

Tayama ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada CHO –K1 hücrelerinde, propil ve bütılparaben maruziyetinin meydana getirdiği primer DNA hasarı comet yöntemi ile tespit edilmiş ayrıca sitogenetik yöntemlerle de bahsi geçen paraben estrelerinin kardeş kromatid değişim (SCE) ve kromozom aberasyonu (CA) frekansını artırdığı tespit edilmiştir (Tayama vd. ,2008).

Martin ve arkadaşlarının (2010) Vero hücre hattını kullanıldığı çalışmada 24 saatlik propil paraben maruziyetinin hücre canlılığından çok hücre proliferasyonunu etkilediği; mitotoik hücre yüzdesinde muamele edilen madde dozuna bağlı olarak azalma olduğu bildirilmiştir. Genotoksik etkiler ise DNA’da çift iplik kırıkları ve oluşan oksidatif hasar şeklinde gözlemlenmiş, diğer parabenlerin genotoksik etkilerinin memeli hücreleriyle yapılacak daha fazla çalışma ile aydınlatılması üzerinde durulmuştur.

Mekeer ve arkadaşları (2011) infertilite kliniğine başvuran hastalarda üriner paraben varlığı ile serum horman seviyesi, semen kalitesi ve sperm DNA hasarı arasında bir ilişkiyi araştırdıkları epidemiyolojik çalışmada hastaların idrarlarında metil, propil ve bütıl paraben tespit edilmiştir. Seçilen parametrelerden elde edilen sonuçlarla metil ve propil varlığı arasında anlamlı bir ilişki kurulamamış, bütıl parabenin serum horman seviyesi ve geleneksel semen kalite parametrelerine etki etmezken sperm DNA’sında hasar oluşturduğu tespit edilmiştir. Sperm DNA hasarı comet yöntemi ile belirlenmiştir.

Isırgan otunun paraben tarafından indüklenen genetik hasara karşı koruyucu etkisinin araştırıldığı tez çalışmasında parabenin 150 mg/kg dozuyla beslenen Albino farelerde canlı ağırlıklarda ve organ ağırlıklarında istatistiksel açıdan önemli bir azalma olduğu, kromozomal anormallik ve MN sıklığında da önemli bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir (Seven, 2015).

Etil, metil, popil ve bütıl parabenin 125-1000 µg/mL aralığında dört dozunun genotoksisite potansiyelinin değerlendirildiği tez çalışmasında; insan lenfositlerinin

kullanıldığı *in vitro* deneylerde parabenlerin kardeş kromotid değişimi ve MN sıklığını istatistiki olarak önemsiz bir oranda artırdığı ancak; yüksek dozlarda istatistiki olarak anlamlı oranda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir. *In vivo* çalışmalarda *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) yapılmış kullanılan hiçbir paraben dozunun genetik hasar yol açmadığı tespit edilmiştir (Ayar, 2013).

1.2. Çalışmada Kullanılan Genotoksisite Testleri

1.2.1. Comet testi

Tek hücre jel elektroforezi (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) veya mikrojel elektroforezi olarak da isimlendirilen Comet Testi, primer DNA hasarı tespitinde kullanılan hızlı, basit, duyarlı ve yaygın kullanım alanına sahip bir yöntemdir.

İlk kez Rygberg ve Johanson'ın 1978'de hafif alkali koşullarda hücreleri lize ederek DNA zincir kırıklarını belirledikleri yöntem; 1984'te Ostling ve Johanson tarafından nötral koşullar kullanılarak modifiye edilmiştir. Yöntemde incelenecek hücreler agar ile lam üzerine ince bir tabaka oluşturulacak şekilde yayılır ve DNA'nın serbest kalmasını sağlayacak liziz solüsyonunda bir süre bekletildikten sonra elektroforez gerçekleştirilir. Elektroforez sonrası hücrelerin seyrini tespit edebilmek için DNA bağlayıcı herhangi bir floresan boya ile boyama yapılarak hücreler floresan mikroskopu altında incelenir. Hasarsız DNA sağlam bir bütün olarak elektroforezi tamamladığından kuyruk oluşturmaz. Ancak hasarlı DNA'da kırık uçlar farklı moleküler ağırlıklara ve farklı elektrik yüklere sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek testin Comet testi olarak adlandırılmasına ilham olan kuyruklu yıldız görünümü oluşturlar (Martin vd., 1993).

DNA'da zincir kırığına neden olan ajanlar DNA molekülünün büyüklüğünü azaltır ve Comet testi gibi DNA zincir kırıklarını ölçmeye yarayan yöntemler de genellikle bu prensibi esas alır. Nötral koşullarda DNA çift zincir kırıkları tespit edilebilmekteyken, tek zincir kırıklarının tespit edilebilmesi için çift sarmalın açılması gerekmektedir. Bu nedenle 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından deney yüksek pH koşullarında yapılarak DNA tek zincir kırıklarının belirlenmesini sağlayan alkali tekniği geliştirilmiştir. Bu teknik ayrıca DNA çapraz bağlarının ve tamamlanamamış ekzisyon

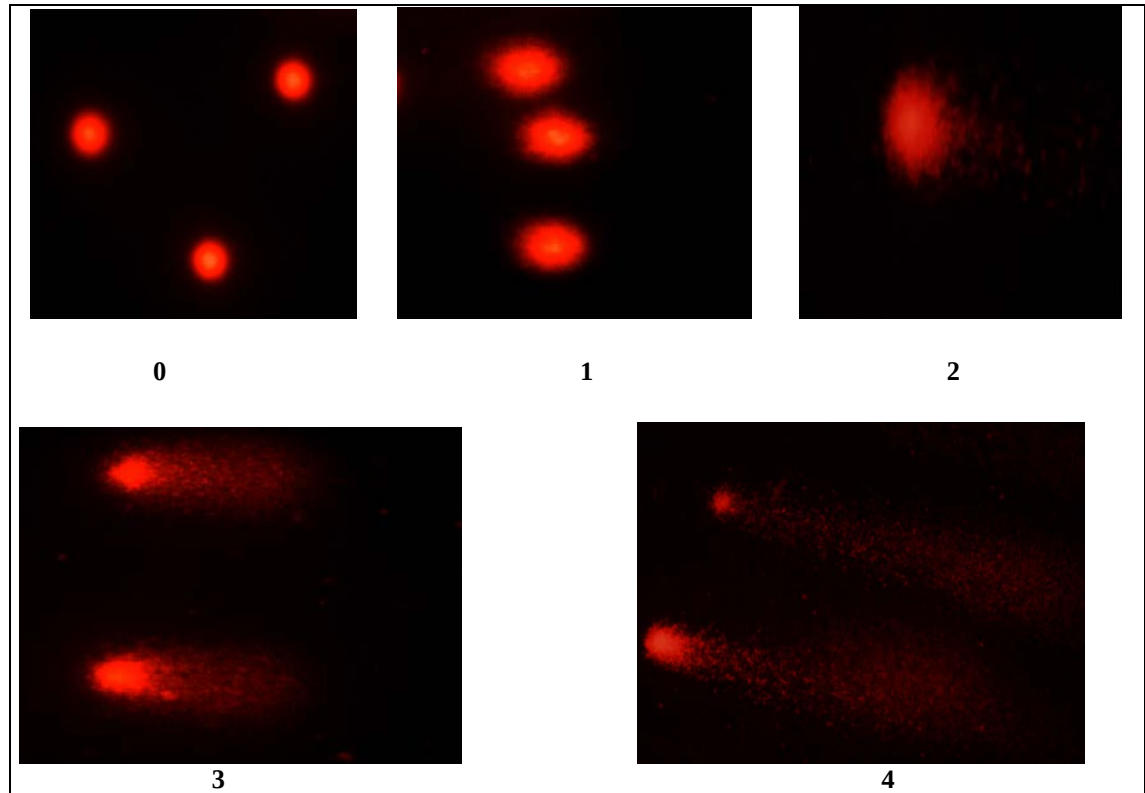
tamir bölgelerinin tespitinde de kullanılmakta ve son yıllardaki çalışmalarda alkali comet yöntemi tercih edilmektedir (Tice vd., 2000).

Alkali Comet yönteminde hücreler lamaların yüksek veya normal erime ısıları agaroz jel ile kaplanarak hazırlanan slaytlar üzerine yayılarak incelenir. Yöntemde ilk aşama incelenecek hücre materyalin türüne göre uygun protokollerle elde edilmesidir. Örneğin lenfositlerle çalışılacaksa lenfositlerin ficoll, lymphoprep veya histopaque gibi ayrıcı kimyasallarla elde edilmesi, dokular ile çalışılacak ise dokuların tripsin-EDTA ile muamele edilip proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Elde edilen hücreler düşük erime ısıları agaroz jel ile karıştırılarak hazırlanan slaytlar üzerine yayılır. Bundan sonraki aşama lizis aşamasıdır. Lizis proteinlerin yıkılarak DNA'nın serbest kalmasını sağlayacak deterjan ve tuz ihtiva eden solüsyonda üzerine hücrelerin yayıldığı slaytların en az bir saat en çok bir gece bekletildiği süreçtir. Lizis sonrasında DNA'lar serbest kaldığından ışıktan kaynaklanacak kırılmaları engellemek için çalışılan ortamın karanlık olmasına dikkat edilmelidir. Alkali comet yönteminde DNA tek zincir kırıklarının da tespit edilmesi amaçlandığından DNA sarmalının açılması için lamalar elektroforez tankında alkali ($\text{pH} \geq 13$) yürütme solüsyonunda 20 dakika bekletildikten sonra elektroforez gerçekleştirilir. Elektroforez sonrası nötralizasyon solüsyonu ile yıkanan lamalar flüroresan mikroskopunda incelemek için DNA spesifik boyalar ile boyanarak görüntüleme ve değerlendirme aşamasına geçilir (Singh vd., 1988; Collins, 2004).

DNA'daki hasar ile göç eden DNA miktarı arasında doğru orantı vardır. Düşük DNA hasarında tam bir kuyruk oluşumu gözlenmez ancak çekirdek yapısı hasarsız olanlara göre daha yaygın düzensiz bir görünümde olur. Hasar arttıkça kuyruk uzunluğu da artar. Bu da comet testinde DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesine olanak sağlamaktadır. DNA hasarının kantitatif olarak tayin edilmesinde belirlenen hasar skorlama cetveline göre gözle değerlendirme yapılabilmektedir. Ancak son yıllarda yaygınlaşan ve daha objektif analiz olanağı sunan yazılım programları (*Comet Görüntü Analiz Programları*) kullanılarak comet kuyruk uzunluğu veya kuyruktaki DNA yüzdesi ölçümü yapılabilmektedir (Martin vd., 1993).

Gözle değerlendirmede hücreler hasar düzeylerine göre sınıflandırılır ve oluşturulan skorlama cetvelinde genel olarak hücreler 5 kategoriye ayrılmıştır. Zarar görmemiş kuyruk oluşturmamış yuvarlak hücreler 0 olarak değerlendirilirken; DNA hasarı oluşan hücrelerde kuyruk uzunluğu kıstadan uzuna doğru numaralandırılarak değerlendirilir (Şekil 1.1). Deneyde oluşturulan her grup için toplamda 100 hücre

sayılarak belirlenen cetvele göre skorlama yapılır. Bu yöntemde özel bir yazılım programına ihtiyaç olmadığından daha ucuzdur. Ancak kişisel algının devreye girdiği bu yöntemde bir çalışmadaki tüm skorlamanın aynı kişi tarafından ve skorlamalar arasında çok uzun zaman aralıkları bırakılmadan yapılması önerilmektedir. Lamlar incelenirken kontrol grubu dahil çoğu lamın kenarlarında yerleşen DNA'larda kuyruklu görüntü olduğundan skorlama yaparken sayım lamin orta kısımlarda yapılmalıdır (Forchhammer ve ark. 2008).



Şekil 1.1. Görsel skorlama tekniği ile DNA'ların hasar derecesine göre sınıflandırılması

Comet görüntü analiz programlarının kullanıldığı bilgisayarlı görüntü analizinde ise mikroskop üzerinde kapalı sistem dijital kamera bağlantısı bulunmaktadır. Floresan mikroskobunda boyanan preparatlarda belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki floresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu prensipten hareketle comet görüntülerini analizlemek için özel olarak geliştirilen yazılım programları aracılığı ile DNA hasarı; kuyruk uzunluğu, kuyruk DNA yüzdesi, kuyruk momenti gibi parametrelerle ölçülmektedir (Collins ve Osoz, 2008).

DNA zincir kırığı ile karakterize hasar tespitinde *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda tercih edilen Comet yöntemi; DNA onarım ve antioksidan araştırmalarında, apoptozis çalışmalarında, biyolojik izleme araştırmaları ve klinik çalışmalarda da sıklıkla kullanılmaktadır (Dinçer, 2010).

Yaşam şekilleri, beslenme ve hatta egzersizin, mesleki kimyasal maruziyetin etkilerini izlemede bunu yanında çeşitli hastalıklarda artmış DNA hasarının belirlendiği klinik araştırmalarda da comet yöntemi kullanılmaktadır (Sardaş vd., 2013).

Comet yöntemi çeşitli şekillerde modifiye edilerek farklı araştırma alanlarında kullanılabilir. Örneğin; hücrel materyal *in vitro* olarak hidrojen peroksit veya UV gibi genotoksik bir ajana maruz bırakıldıktan sonra hücrelerde DNA onarım kapasitesi belirlenebilmektedir. Antioksidan araştırmalarında da genotoksik ajan uygulanan hücreler daha sonra antioksidan potansiyeli araştırılan madde ile muamele edilirler (Gedik vd., 1992; Silva vd., 2009).

Oksidatif DNA hasarının tespiti de comet yöntemine bir basamak daha ekleyerek yapılabilir. Bu basamak lizisten sonra hücrelerin spesifik DNA onarım enzimleriyle inkübe edilmesidir. Hücreler okside olmuş pürin bazlarının belirlenmesi için formamidopirimidin DNA glikozilaz (Fpg) enzimi ile okside olmuş pirimidin bazlarının belirlenmesi için ise Endonükleaz III (Endo III) enzimi ile muamele edilir. Bu endonükleazlar okside olmuş hasarlı bazı tanıyarak o bölgede ekstra sarmal kırıkları oluştururlar ki bu ekstra sarmal kırıkları, oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak değerlendirilmektedir (Collins vd., 1993; 1996).

Son yıllarda gen veya dizi düzeyinde hasar belirleyebilmek amacıyla belirli DNA dizilerine spesifik işaretli proplar kullanılarak Comet yöntemi floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) tekniği ile birleştirilmiş ve FISH -comet olarak adlandırılmıştır (Spivak vd., 2009).

Comet yöntemi her tür ökaryotik hücreye uygulanabilirliği, az hücre gerekliliği, çalışma optimize edildikten sonra nispeten kolay ve ucuz oluşu, kısa sürede az hasar seviyesini bile kalitatif ve kantitatif ölçebilen hassas bir teknik oluşu, radyoaktif işaretleme gerektirmeyişi gibi avantajları ile son dönemde *in vivo* ve *in vitro* pek çok çalışmada kullanılan bir genotoksisite testidir (Tice vd., 2000; Collins, 2004).

DNA hasarı ve çapraz bağlanma oluşturduğu bilinen kimyasallarla yapılan validasyon çalışmasının sonucunda da comet yönteminin DNA hasar tespitinde hassas bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Tice vd., 2000).

Tüm avantajlarının yanında Comet tekniğinin en çok tartışılan tarafı yöntemde standart bir protokolün olmamasıdır. Yöntemde lizis solüsyonun pH'sı ve lizis süresi, yürütme solüsyonun pH ve sıcaklığından kaynaklanan değişken elektroforez koşulları metodun hassasiyetini ve sonuçları etkilemektedir (Forchhammer vd., 2008).

1.2.1.1. Comet yöntemi ile yapılan çalışmalar

Comet yöntemi bazen tek başına bazen de diğer test sistemleriyle birlikte farklı hücre tiplerinde pestisitler, katkı maddeleri, ilaçlar, doğal fenolik bileşikler gibi pek çok kimyasalın *in vitro* ve *in vivo* genotoksik veya antigenotoksik etkilerinin tespitinde kullanılmaktadır.

Yaygın kullanılan iki pestisit olan Asefat'ın ve Klorprifos'un *in vivo* genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmada comet testi kullanılmıştır. Pestisitlerin 6 farklı dozu 24, 48, 72 ve 96 saatlik sürelerle farelere oral olarak verilmiştir. Uygulamalardan sonra farelerden alınan lökositlerde iki pestisit de 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulanan tüm dozlarında da comet kuyruk uzunluğunun önemli derecede arttığı; 72 ve 96 saatlik sürelerde comet kuyruk uzunluğundaki artışın düştüğü tespit edilmiştir. Primer DNA hasarının tespit edildiği bu yöntem ile uzayan maruziyet süresinde hasarlı olan DNA'nın onarıldığı yorumu yapılmıştır (Rahman vd., 2002).

Kimyasalların genotoksik etkilerinin belirlenmesinde aynı test yöntemleri kullanılsa bile uygulamanın *in vivo* ve *in vitro* yapılması maddelerin metabolize edildikten sonraki genotoksisite potansiyeli ve etki mekanizmalarının yorumlanması açısından önemlidir. Özkan ve arkadaşları (2009) asefat'ın genotoksik etkilerini belirlemek için araştırmalarını insan lenfosit kültüründe *in vitro* koşullarda yapmışlardır. Kültüre edilmiş insan lenfositlerinde yapılan çalışmada Asefat'ın kromozomal anormalliği, SCE ve MN frekanslarını artırdığı ve doza bağlı olarak comet kuyruk uzunluğunu da artırdığını bildirmişlerdir.

Sardas ve arkadaşları (1998), operasyon süresi 133 dakika olan isofluran anestezi uygulanan hastalardan aldıkları lenfositlerde DNA hasarını comet yöntemi ile araştırmışlardır. Hastalardan farklı saatlerde alınan lenfositlerde uygulamanın ilk saatinden itibaren artış gösteren comet kuyruk uzunluğunun 3. günde azalmaya başladığını ve 5. günde tamamen kontrol değerlerine indiğini göstermişlerdir. 2001 yılında Karabıyık ve arkadaşları isofluran ve sevofluran anestezileri sonrası farklı zaman dilimlerinde oluşan DNA hasarını comet yöntemi ile ölçmüş ve bir önceki

yayınla uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada da DNA hasarının 60. dakikada başladığı; 120. dakikada pik yaptığı ve 5. günde ortalama kontrol değerlerine indiği görülmüştür. Bu değişiklikler gruplar arasında (cinsiyet- yaş) farklılık göstermemiştir (Karabıyık vd., 2001).

Periton diyaliz tedavisi gören 27 hastada muhtemel DNA hasarının Comet test yöntemi ile araştırıldığı tez çalışmasında, kuyruktaki DNA yoğunluğu ve comet kuyruk uzunluğunun periton diyaliz tedavisi alan hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre önemli oranda arttığı görülmüştür. Aynı çalışmada, ferritin düzeyi 500'ün üzerinde olan periton diyalizi tedavisi gören hastalarda kuyruk uzunluğunda istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gözlenmiştir (Nas, 2011).

Tüm dünyada tartışma konusu olan, yapılan araştırmaların sonucuna göre bazıları yasaklanan katkı maddeleri genotoksitesi en çok araştırılan kimyasallardandır. Pek çok ülkede kullanımı yasaklanan un ağartıcısı olan potasyum bromatın *in vitro* genotoksik etkilerini, insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde comet, mikronükleus ve timidin kinaz (TK) gen mutasyon testlerini kullanarak belirleyen Luan ve arkadaşları (2007), tek ve çift zincir kırıklarını belirlemek için hem alkali hem de nötral comet testlerini kullanmışlardır. Uygulanan tüm test sistemlerinden elde edilen sonuçlar ile bu maddenin DNA'da hasara neden olduğu bildirilmiştir.

İnsan lenfositlerinde DNA hasarı oluşturduğu tespit edilen katkı maddelerinden quinolin sarısı ve brilliant siyahının etkileri Macioszek ve Kononowicz (2004) tarafından, antioksidan etkili etoksiquin'in etkileri Blaszczyk (2006) tarafından araştırılırken diğer genotoksisite testleri ile birlikte comet yöntemi de kullanılmıştır.

Nilüfer tohumu ekstarktının antigenoksik etkileri H₂O₂ (25 µM) ile DNA hasarı oluşturulan insan lenfosit hücrelerinde comet yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Comet kuyruk momenti parametresi kullanılarak nilüfer tohumu ekstarktının herhangi bir genotoksik etki göstermediği gibi DNA hasar oluşumunu engelleyici etkisi olduğu bildirilmiştir (Yen vd., 2005).

Uzun süreli ve yoğun egzersizin DNA hasarına yol açtığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Şardaş ve arkadaşları (2012) yarışlara katılan yoğun egzersiz programına tabi profesyonel kürekçilerde DNA hasarı tespitini comet kuyruk DNA yüzdesi parametresine göre belirlemişlerdir. Kontrol grubu olarak seçilen benden eğitimi öğrencilerine göre kürekçilerde comet kuyruk DNA yüzdesinin dolayısıyla DNA hasarının daha fazla olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın ikinci adımında kürekçi grubuna

60 gün süreyle antioksidan desteği (vit E 400 IU/gün) verilmiştir. 60 günün sonunda yeniden DNA hasar değerlendirmesi yapıldığında ilk ölçülen değerlere göre daha düşük DNA hasarı tespit edilmiş, E vitaminin iyi bir antioksidan olarak işlev gördüğü DNA hasarını sınırlandırdığı bildirilmiştir.

Bazı katkı maddelerinin (sitrik asit, benzoik asit, brilliant mavi ve turuncu jel gıda boyası) 50- 500 µg/ml aralığındaki 4 dozunun 1 saatlik uygulama sonucu insan sperm hücrelerindeki etkilerinin comet yöntemi ile araştırıldığı çalışmada tüm maddelerin uygulanan en yüksek dozlarında ciddi hasar oluşturduğu bildirilmiştir. Kullanılan maddeler arasında verilen madde ile oluşturduğu kuyruk uzunluğu arasındaki ilişkiye dayanarak yapılan karşılaştırmada *in vitro* sperm hücrelerine, brilliant mavi ve turuncu jel gıda boyasının sitrik asit ve benzoik asite göre daha fazla hasar verdiği bildirilmiştir (Pandir, 2014).

Sperm hücrelerinde DNA hasarı tespiti son yıllarda infertilite araştırmalarında önem kazanmış bir konudur. Comet testi sperm hücrelerinde DNA hasar oranının tespitinde etkili bir şekilde kullanılabilir (Baumgartner vd., 2009). Mesleki kimyasal maruziyetinin sperm DNA'sı üzerindeki etkilerinin comet yöntemi ile araştırıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin Bandırma borik asit üretim alanında çalışan 428 işçiden alınan sperm örneklerindeki DNA hasar tespiti comet yöntemi ile değerlendirilmiş ve mesleki kimyasal maruziyetinin sperm DNA'sında hasara sebep olduğu bildirilmiştir (Duydu vd., 2012).

Mesleki kimyasal maruziyeti mesleki hastalıkların oluşmasında en önemli etkenlerden biri olarak yaşam kalitesini düşürmektedir. Mesleki olarak maruz kalınan kimyasalların genotoksik etkilerinin farklı araştırmalar ile belirlenmesi çalışma koşullarının iyileştirilmesi açısından önemlidir. En az 6 ay süre ile kanser hastalarına kemoterapi ve radyoterapi uygulayan 30 hemşire ve 30 sağlık teknisyeninin lenfositlerindeki olası DNA hasarı comet yöntemi ile değerlendirilmiş, kemoterapi uygulayan hemşirelerin lenfositlerinde DNA hasarı kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur ($p<0,001$). Radyoterapi uygulayan sağlık teknisyenlerinin de lenfositlerinde DNA hasarı kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (Ündeğer vd., 1999).

Grover ve arkadaşları (2003) pestisit üretiminde çalışan 54 işçinin lökositlerinde DNA hasarını Comet yöntemi ile araştırılmıştır. Yörede yaşayan sosyoekonomik düzeyleri ve yaşam biçimleri işçilere benzeyen kontrol grubuyla pestisit işçilerinin

DNA hasar düzeyleri karşılaştırılmıştır. Comet kuyruk uzunluğu parametresinin değerlendirildiği çalışmada işçilerde comet kuyruk uzunluğu kontrol grubuna kıyasla istatistiki olarak anlamlı derecede uzun çıkmış ve çalışma koşullarında maruz kalınan pestisitlerin işçilerde DNA hasarı oluşturduğu bildirilmiştir.

Roma-Torres ve arkadaşları 2006 yılında yayınladıkları çalışmada, petrol rafinerisinde çalışan bireylerden aldıkları kan örneklerinde comet yöntemini uygulayarak DNA hasarını değerlendirmişlerdir. Bireylerde sigara alışkanlıkları da ayrı parametre olarak değerlendirilmiştir. İşçilerdeki DNA hasarı istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş, sigara kullanımı ile genotoksik etkiyi gösteren parametreler arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir.

Arayasiri ve arkadaşları (2010), Bangkok'taki trafik polislerinin benzen ile 1,3 bütadien maruziyeti ve bu maruziyetin etkilerini araştırmışlardır. Havada, polislerin kan ve idrarlarında benzen ile 1,3 bütadien ve metabolitlerinin taraması yapılmış, trafik polislerinin lenfositlerinde DNA hasarı comet yöntemi ile belirlenmiştir. Ofis polisleri ile karşılaştırıldığında trafik polislerinde artan düzeyde DNA zincir kırığı tespit edilmiştir.

Sigara kullanımı hatta pasif içiciliğin de insan lenfosit DNA'sında oluşturduğu hasar çalışmalarında comet yöntemi kullanılmıştır. Kimyasal maruziyetinin sonuçları; maruz kalınan kimyasal miktarı, maruziyet yolu ve maruz kalan kişiler arasındaki farklılıklardan dolayı değişebilmektedir. Weng ve arkadaşları (2009) sigara kullanımının oluşturduğu DNA hasarı ile XRCC1 (X-Ray Repair Cross-Complementing) geni polimorfizimi arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. XRCC1 proteini DNA tek sarmal kırıklarının onarımı için gereklidir. DNA hasar değerlendirmesinde comet parametrelerinden kuyruk momenti kullanılmıştır. XRCC1 399Gln genotipindeki bireylerde artan DNA hasarının göstergesi olarak comet kuyruk momentinde artış bildirilmiştir.

Comet yöntemi ile FISH yönteminin bir arada kullanımı hasar oluşan bölgelerin tespitine de olanak sağlamaktadır. Arutyunyan ve arkadaşları (2005) yaygın kullanılan kemoterapi ilaçlarından cisplatin (*cis*-DDP) ve bleomisin (BLM)'in insan kan hücrelerinde DNA ve özellikle telomerler üzerinde oluşturduğu hasarını tespit etmek için comet yöntemini FISH yöntemi ile kombine ederek kullanmışlardır. Telomer spesifik proplarla yapılan comet çalışmasında ilk aşamada comet protokolü tamamlanmıştır. Comet slaytlarına telomere özel proplar (ısıtılmış) uygulandıktan sonra

37 °C’de bir gece bekletilmiş ve ertesi gün durulama solüsyonundan geçirilen slaytlar SYBG boyası ile boyanarak incelenmiştir. Comet başındaki ve kuyruğundaki telomer işaretlerine göre telomer hasarı değerlendirilmiştir. Telomer işaretlerinin kuyruk kısmında oluşu telomerin de hasar gördüğünü göstermektedir. Sonuçta bleomisin cisplatine göre daha fazla telomer hasarı oluşturduğu bildirilmiştir.

Nörodejanratif hastalıkların gelişiminde oksidatif hasarın katkısı olduğu öne sürülmektedir. DNA hasarını daha spesifik olarak tayin edebilmek için comet yöntemi yapılan bazı modifikasyonlarla etkili bir şekilde kullanılabilen örneğin oksidatif hasar comet yönteminde Fpg (formamidopirimidin glikozilaz) enzimi kullanılarak tespit edilebilmektedir. Fpg proteini oksidatif DNA baz hasarlarını (8-OH guanin) tayin etmek için kullanılmaktadır. Comet protokülünde lizis gerçekleştirildikten sonra lamalar elektroforeze konulmadan önce, enzim reaksiyon tamponu (pH:8) ile 3 kez yıkanır. Aynı tamponla Fpg enziminin dilüsyonu yapılır ve bu enzimlerden lamlara eklenerek üzerleri lamelle kapatılır. Daha sonra Comet testindeki elektroforez, nötralizasyon, boyama ve değerlendirme işlemleri aynı şekilde uygulanır. Baydar ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan çalışmada, Parkinson ve Multipl Skleroz (MS) hastalarının periferik lenfositlerindeki DNA hasar düzeyi, kan örneklerine 50 µM H₂O₂ ve oksidatif pürin özgül DNA onarım enzimi Fpg) uygulamasından önce ve sonrasında Comet yöntemiyle saptanmıştır. Parkinson hastalarının lenfositlerinde DNA hasarı kontrol grubuna kıyasla önemli şekilde artmıştır. Bununla birlikte, Parkinson hastalarının lenfositlerindeki DNA iplik kırıklarında H₂O₂ ya da Fpg uygulaması ile önemli artış meydana gelmemiştir. MS hastalarının DNA hasarı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. MS hastalarının lenfositlerindeki DNA hasarında H₂O₂ ve Fpg uygulamasının ardından önemli artış gözlenmiş ve bu hastaların oksidatif DNA hasarına duyarlı oldukları ileri sürülmüştür.

Tozan-Beceren ve arkadaşları (2011) teşhisi yeni koyulan 26 kolorektal kanser hastasının ve birinci derece yakın bireylerin (n=26) ve kontrol grubunun kan örneklerinde DNA hasar değerlendirmesini comet yöntemi ile yapmışlardır. Kolorektal kanser hastaları ve birinci derece yakınlarının periferik kan lenfositlerinde comet tekniği uygulanması sonucunda elde edilen ortalama kuyruk DNA yüzdesi değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar kolorektal kanser teşhisi konmuş hastalarda ve özellikle

de birinci derece yakınlarında comet tekniğinin, DNA hasarını belirlemede bir biyogösterge olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

DNA hasar tespitinde en etkili test yöntemlerinden biri olarak farklı araştırma gruplarınca kabul gören comet yönteminin adli bilimlerde de kullanıldığı görülmektedir. Ölüm sonrası zamanın belirlenmesinde moleküler yöntemler son yıllarda sıklıkla kullanılmaktadır. Sıçanlarla ölüm zaman tayini amacıyla yapılan çalışmalarda sıçanlardan ölümünün ardından belli saat aralıklarıyla alınan kesitler nötral ve alkali comet koşullarında incelenmiştir. Değerlendirilen tüm comet parametrelerine göre ölüm sonrası süre arttıkça bu değerlerde de lineer artış gözlenmiş ve ölüm zamanı tespitinde kullanılabilecek yeni yollardan biri olabileceği ancak daha fazla çalışma yapılmasının rutin kullanımlar için gerekliliği üzerinde durulmuştur (Zhen vd., 2006). Miteva ve arkadaşlarının (2009) yaptıkları bir çalışmada adli bilimlerde önemli başka bir konu olan cinsel saldırı zamanını belirlemede sperm hücrelerindeki süreye bağlı DNA degradasyonunun moleküler bir saat olarak kullanılıp kullanılamayacağını araştırmıştır. DNA degradasyonu belirlemede comet yöntemini kullanmışlardır. Zaman bağlı artan comet kuyruk uzunluğu comet yönteminin saldırı zaman tayininde faydalı moleküler markır olabileceğini düşündürmüş olmakla birlikte rutin uygulamalarda kullanım için daha büyük ölçekli araştırmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir.

1.2.2. RAPD-PCR yöntemi

DNA dizilerinin *in vitro* koşullarında çoğaltılması esasına dayanan Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); hassas ve spesifik bir tekniktir. Genel olarak çoğaltılması hedeflenen bir DNA bölgesinin uygun bir primerle DNA sentezinin gerçekleştirilmesi esasına dayanır. Moleküler biyolojinin uygulama ve araştırma alanlarında önemli kolaylıklar ve ilerlemeler sağlayan devrim niteliğindeki PCR teknolojisi; klinikte hastalık tanı veya yatkınlık potansiyelinin belirlenmesinde, adli tıpta iz miktardaki biyolojik örneklerden dahi DNA profillerinin elde edilerek vakaların aydınlatılmasında, ilaç üretim ve araştırmalarında ve bitki biyoteknolojisi gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (Klug ve Cummins, 2003).

PCR temelli geliştirilen moleküler belirteçler genetik çeşitliliğin belirlenmesinde önemli kolaylıklar sağlamıştır. Bu belirteçlerden biri de 1990 yılında Willams ve arkadaşlarının rastgele primerleri kullanarak uyguladıkları PCR yöntemi ile elde ettikleri rastgele çoğaltılmış DNA profilidir. RAPD-PCR olarak adlandırdıkları bu

yöntemde hedef genom hakkında bilgiye ihtiyaç duyulmaz. Her PCR uygulamasında tek primer olmak üzere rastgele seçilen 10 bazlık primerler kullanılır (Beceril vd., 1999; Atienzar vd., 2002).

RAPD-PCR yöntemi geliştirildikten kısa süre sonra genetik çeşitlilik, türler arasındaki ilişkiler, popülasyon yapısı gibi birçok farklı konunun araştırılmasında yaygın bir şekilde kullanılır hale gelmiştir. RAPD-PCR tekniğinde DNA polimorfizmi rastgele primerlerle yapılan PCR sonrası elektroforezde oluşan bant profillerine göre belirlenir. Örneklerin DNA profillerini oluşturan bantlardaki sayısal değişiklikler nükleotid dizilim farkını yani polimorfizmi yansıtmaktadır. Böylece belirlenen polimorfizmler genetik ilişkilerin belirlenmesinde filogenetik araştırmalarda önemli kolaylıklar sağlamıştır (Atienzar vd., 2002). RAPD-PCR tekniği taksonomi çalışmalarının yanı sıra pestisit dirençli genlerin belirlenmesi çalışmalarında da kullanılmıştır (Atienzar ve Jha, 2006).

İlk olarak genetik haritalama, taksonomi ve filogenetik çalışmalarda polimorfizmi belirlemek için kullanılan RAPD metodu, daha sonra genotoksisite ve karsinogenez çalışmalarda da kullanılmaya başlanmıştır. Genetik materyalde oluşan hasar sonucu primer bağlanma bölgelerindeki değişiklikler de RAPD profillerinde değişimlere yol açabilmektedir (De Wolf vd., 2004).

Genotoksik ajanlar genetik materyal üzerinde etkili olup DNA ifadesini doğrudan veya dolaylı olarak etkiler, genomik kararsızlığa sebep olurlar. RAPD profillerindeki bant sayı ve yoğunluk değişimleri delesyon, insersiyon, notka mutasyonlar ve kromozomların yeniden düzenlenmesinden kaynaklanan genetik değişiklikler sebebi ile olabilmektedir. Bunun yanında fiziksel veya kimyasal ajanların oluşturdukları DNA hasarları da primer bağlanma bölgelerini değiştirip farklı RAPD profilleri oluşmasına neden olacaktır. Bu nedenle genotoksik etkilerin belirlenmesinde *in vitro* sistemler kullanılarak optimize edilmiş RAPD yöntemi başlangıç için iyi bir tarama tekniği olarak kabul edilmektedir (Becerril vd., 2001).

1.2.2.1. RAPD-PCR yöntemi aşamaları

RAPD-PCR yöntemi için standart bir protokol olmadığından kullanılan her hücre tipi için optimizasyon yapılması gerekmektedir. Yöntemin tüm aşamalarında optimizasyonu deneyin tekrar edilebilirliğini ve dolayısıyla sağlıklı sonuçlara ulaşmayı sağlayacaktır (Szulc vd., 2012).

RADP-PCR yönteminin aşamaları genel olarak;

1. Hücresel materyalden DNA izolasyonu.
2. İzole edilen DNA'da miktar ve kalite tayini.
3. Genomik DNA'nın rastgele seçilen primerlerle optimal şartlarda PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi.
4. Elde edilen PCR ürünlerinin uygun agaroz jelde yürütülmesi.
5. Elektroforezle oluşan RAPD bantlarının UV altında görünür hale gelmesini sağlayacak boyalarla boyanması.
6. RADP bantlarının değerlendirilmesi şeklindedir (Kumar ve Gurusubramanian, 2011).

İlk aşama incelenecek hücresel materyalden uygun yöntemlerle DNA izolasyonu ve sonra da elde edilen DNA'da miktar ve kalite tayinidir. İyi kalitede izole edilen DNA'lar ile PCR optimizasyonu çalışmalarında; uygun DNA konsantrasyonun belirlenmesi de önemlidir. Çünkü farklı DNA konsantrasyonlarıyla yapılan PCR'lar sonrasında farklı RAPD profilleri oluşabilmektedir. Becerril ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada RAPD-PCR'da DNA miktarı artırdığında elektroforezde 3 yeni bant gözlemlenmiştir. Bu noktada başvurulacak kriter uygun konsantrasyon için tekrarlanan RAPD profillerinde stabil bantların elde edilebilmesidir.

PCR en basit haliyle hücrede meydana gelen DNA replikasyonunun *in vitro* şartlarda gerçekleştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Büyükleyla, 2012). PCR reaksiyonun gerçekleştirilebilmesi için kısa DNA parçaları olan primerlere ihtiyaç vardır. RAPD primerleri rastgele seçilen primerler olmakla birlikte seçilen primer dizilerinde GC oranının en az %50 olması -tüm PCR uygulamalarında olduğu gibi- reaksiyon etkinliğini artıracaktır.

PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamada gerçekleşir.

1. Çift sarmal halindeki kalıp DNA'nın yüksek ısıda denatürasyonu,
2. Primerlerin tamamlayıcı olan bölgeler ile birleşmesi,
3. Tamamlayıcı diziyle birleşen primerin yapıştığı zincirin karşılığının *Taq* polimeraz enzimi aracılığı ile uzaması.

Bu üç aşamalı döngü daha sonra birçok kez tekrar edilmekte ve her tekrarda ürün yaklaşık iki katı artmaktadır (Çulcu, 2007; Büyükleyla, 2012).

PCR reaksiyonun optimizasyonunda sadece kalıp DNA'nın kalitesi ile konsantrasyonu değil; primer, deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP); *Taq* DNA polimeraz enzimi ile reaksiyonda kullanılan tampon ve çözeltilerin de konsantrasyonu önemlidir. Kullanılan tüm materyallerin konsantrasyonları birbirleriyle ilişkilidir. Örneğin *Taq* DNA polimeraz enzim gereksinimi kullanılan kalıp DNA veya primere göre değişebilir. Yüksek primer konsantrasyonu primerlerin yanlış bağlanmasına ayrıca primer-dimer oluşumuna neden olmaktadır. Tavsiye edilen primer konsantrasyonunu 0,1-0,5 µM'dır. PCR ürünlerinin spesifikliği açısından dNTP'lerin de düşük konsantrasyonlarda kullanımı önemlidir. *Taq* DNA polimeraz enziminin optimal olarak çalışabilmesi için gerekli olan MgCl₂ konsantrasyonu 0,5-2,5 mM olmalıdır. MgCl₂ konsantrasyonunun az olması bant oluşmamasına neden olabilirken, fazla olması ise istenmeyen bantların oluşmasına neden olabilir (Yılmaz ve Devran 2003).

Reaksiyonun gerçekleştiği aşamalardaki sıcaklık ve süreler de PCR ürün oluşumunu etkilemektedir. Denatürasyon aşaması için 95 °C'de 2 dakika çoğu zaman yeterlidir. Primerin komplementer diziye bağlanması için tam bir bağlanma ısısı vermek uygun değildir. Ancak bağlanma ısısı kullanılan primerin erime ısısının (T_m) hesaplanarak genellikle T_m değerinin 5 °C aşağısı alınarak belirlenir. Primerdeki G ve C sayısı arttıkça T_m derecesi de artar ve aşağıdaki formül ile hesaplanır;

$$T_m = 4 (G + C) + 2 (A + T)$$

RAPD için seçilen primerler için genel olarak düşük bağlanma ısısı (32-36 °C) tercih edilmektedir. Yeni zincirin uzatılma işlemi aşaması ise *Taq* DNA polimeraz enziminin iyi çalıştığı 72 °C'de yapılmaktadır. Her döngüde geometrik olarak çoğaltılan PCR ürünleri için döngü sayısı 25-40 arası olarak belirlenir (Dieffenbach vd., 1993).

PCR tamamlandıktan sonra elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektroforezle ayrıştırılır ve DNA zincirleri etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole ışık kaynağında floresans vererek görünür hale getirilir. Agaroz jel elektroforezide, DNA moleküllerinin ayrışmasında kullanılan agaroz yoğunluğu yürütülecek DNA fragmanları (baz sayısı) göz önünde bulundurularak ayarlanmalıdır (Çulcu, 2007).

Elektroforez sonrası RAPD bant profillerinin değerlendirilme aşamasında, kontrol grupları ile madde muameleli grupların profilleri karşılaştırılır ve polimorfizmi temsil edebilecek bir skorlama yapılır. Skorlamada örneklerin RAPD profillerinde kontrol grubunun bant profili ile karşılaştırıldığında tespit edilen her farklılık (bant kaybı ya da yeni bir bant oluşumu) "1" olarak değerlendirilir ve polimorfik bant sayısı hesaplanır.

Kontrole göre farklılık gözlemlenmeyen profil “0” olarak değerlendirilir. Genotoksisite tespiti için yapılan RAPD yönteminde araştırmacıların sonuçları farklı yollarla dile getirdikleri görülmektedir. Bazı araştırmacılar madde muamelesi ile bant profillerindeki değişimi-oluşan polimorfizmi- genotoksik etkinin göstergesi olarak kabul etmiştir (Noel ve Rath, 2006). Bazı çalışmalarda ise kontrole göre polimorfizim yüzdesi hesaplanarak sonuç verilmiştir (Liu vd., 2007). Genotoksik etkinin değerlendirilmesinde genomik kalıp stabilite (GKS yüzdesi) kaybı da kullanılan diğer bir yöntemdir. Kontrol örneğinin GKS yüzdesi 100 olarak kabul edilir. Madde uygulanan örnekler için GKS yüzdesi;

$$\text{GKS (\%)} = 100 - 100.(a/n)$$

formülü ile hesaplanır. “a” değeri her bir örnekteki belirlenmiş olan polimorfik bant sayısını, “n” değeri de kontroldeki toplam bant sayısını ifade etmektedir.

İyi optimize edilen bir RAPD yöntemi diğer yöntemlerde karşılaştırıldığında kromozomal düzeyde tespit edilemeyen minör değişimlerin dahi tespit edebilmesiyle daha hassas olarak değerlendirilebilir. Buna ek olarak RAPD-PCR hedef genom hakkında ön bilgi gerektirmeyişi, rastgele primerlerle çalışıp kısa süre sonuç alınabilmesi, direk DNA dizisi üzerindeki değişimleri yansıtabilmesi ve nispeten ucuz olması gibi pek çok avantajıyla tercih edilen bir yöntem olmakla birlikte bazı dezavantajları da vardır (Gupta ve Sarin, 2009).

Yöntemde PCR şartları hassas olduğundan döngü ve reaksiyon koşulları profilleri etkileyebilmekte bu da deneyin tekrar edilebilirliğini güçleştirmektedir. Ayrıca yöntemde düşük sıcaklıklarda bağlanma sıcaklığına sahip GC içeriği yüksek primerler tercih edildiğinden RAPD ile taranan bölgeler çoğunlukla GC bakımından zengin bölgelerdir ve bakımdan da tüm genom örneklenmemektedir. Çok sayıda RAPD bantları elde edebilmek için düşük bağlanma sıcaklığı kullanılmasının sahte ampliconları oluşturabileceği bildirilmiştir (Atienzar ve Jha, 2006).

Son dönemde teknolojilerinden toksikolojide yaygın ve etkili kullanımları alan mikroarray yöntemi uygulamaları ile RAPD yönteminin hükmünü yitirip yitirmeyeceği tartışılrsa da RAPD-PCR yöntemi çok daha ucuz oluşuyla hala caziptir ancak bunu dışında RAPD belirteçleri ile mikroarray ve SNP’lerin aksine kodlanmayan bölgeler dahil tüm genom taraması yapılmaktadır. RAPD yönteminde aynı anda değişimlerin belirlenip klonlanabilmesi de onu hala diğer test sistemleri içinde popüler kılan özelliklerinden biri olarak bildirilmiştir (Atienzar ve Jha, 2006).

1.2.2.2. RAPD-PCR yöntemi ile yapılan genotoksisite çalışmaları

Literatürde RAPD belirteçlerinin; çeşitli şekilde maruz kalınan doğal veya sentetik kimyasalın *in vivo* ve *in vitro* olarak genotoksisite tespitinde, ayrıca ekotoksikolojik biyoizleme çalışmalarında ve genomik kararsızlık ile kanser türleri arasındaki ilişkilerin belirlendiği araştırmalarda yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir. Mutajen olduğu bilinen ajanlarla yapılan çalışmalarla RAPD yönteminin diğer yöntemler kadar etkili olduğu hatta bazı çalışmalarda minör değişimlerin dahi RAPD belirteçleri ile tespit edilebildiğini ortaya koymuştur (Castano ve Becerril, 2004).

Becerril ve arkadaşları (1999) balık hücrelerinde farklı süre ve konsantrasyonlarda Mitomycin-C'nin oluşturduğu DNA hasarlarının belirlenebilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada RAPD-PCR yöntemini kullanarak MMC'nin genotoksik etkileri RAPD profilleri ile de gösterilebilmiştir.

Bakırın farklı konsantrasyonlarının su piresinde (*Daphnia magna*) genotoksik etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmada rastgele seçilen 5 primerle RAPD-PCR yöntemi uygulanmış, maddenin uygulandığı her konsantrasyonunda maruz bırakılan gruplardan elde edilen bant profillerinde kontrol grubuna göre sayısal değişimler ve bant yoğunluklarında değişimler tespit edilmiştir (Atienzar vd., 2001).

Midye larvalarında 4-n-Nonilfenol ve 17- β estradiol maddelerinin farklı konsantrasyonlarının 8 günlük uygulaması sonucu DNA üzerindeki etkiyi belirlemek için yapılan çalışmada RAPD belirteçleri seçilmiş ve uygulama için 8 primer kullanılmıştır. PCR'ı yapılan örneklerde özellikle 5 primerin kontrol grubuna kıyasla farklı bant profilleri oluşturduğu dolayısıyla bu maddelerin midye larvalarında genomik kararsızlığa yol açtığı rapor edilmiştir (Atienzar vd., 2002).

Siklofosamid ve dimetoat'ın genotoksik etkilerinin RAPD belirteçleri ile değerlendirildiği çalışmada Zebra balıkları 4 gün süre ile bu maddenin üç farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmıştır. 6 primer ile yapılan RAD-PCR yönteminde özellikle bir primerden elde edilen profiller dikkat çekicidir. Bu primere ait RAPD profilinde kontrol grubunda olan ancak madde uygulanan grupların hemen hiçbirinde olmayan bir bant tespit edilmiştir (Zhiyi ve Haowen, 2004).

Literatürde çevresel kirleticilerin özellikle ağır metallerin genotoksik etkilerinin iyi birer biyoindikatörü olarak kullanılan bazı bitki türlerinde de (*Allium cepa*, *Hordeum vulgare*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Vicia faba*, ve *Zea mays* gibi) RAPD belirteçlerinin etkili bir şekilde kullanıldığı görülmektedir.

Liu ve arkadaşları genotoksik hasara yol açtığı farklı sitogenetik yöntemler ile ortaya koyulan kadmiyumun 2005 yılında hardal bitkisi; 2007 yılında da çeltik DNA'sı üzerindeki hasarını RAPD belirteçlerini kullanarak tespit etmişlerdir. Her iki çalışmada da 12 farklı primer ile kurulan PCR'lar sonucu kadmiyumun farklı konsantrasyonlarına 6 gün süreyle maruz bırakılan hardal bitkisinden ve maruziyet süresi 8 gün olan çeltiklerden elde edilen RAPD profillerinde kontrol gruba göre farklı bant profilleri elde edilerek genomik kararsızlığın hardal bitkisinde %44'lere; çeltikte ise %66'lara kadar çıktığı bildirilmiştir (Liu vd., 2005; Liu vd.,2007).

Cenkçi ve arkadaşları (2009) fasulye fidelerinde (*Phaseolus vulgaris*) bir haftalık civa, bor, krom ve çinkonun 150 ppm ile 350 ppm'lik dozlarına maruziyetin oluşturacağı genotoksisiteyi belirlemek amacıyla RAPD belirteçlerini kullanmışlardır. 13 OPB primeri ile yapılan PCR'lardan elde edilen RAPD profilleri kontrol grubu kıyaslanarak değerlendirilmiştir. Madde uygulamalarının primer bağlanma bölgelerinde neden olduğu değişimler olarak yorumlanan farklı RAPD profilleri elde edilmiştir.

Sucul makrofitler de özellikle ağır metal araştırmalarında sıklıkla kullanılan biyoindikatörlerdir. Sucul makrofitlerden *H. verticillata* ve *C. demersum*'dan 96 saatlik ağır metal maruziyeti sonrası izole edile DNA'lar rastgele seçilen 30 primer ile çoğaltılmış ve elde edilen RAPD profilleri değerlendirilmiştir. Gupta ve Sarin (2009) tarafından yapılan bu çalışmada kadmiyum, civa ve bakıra maruz bırakılan bitki gruplarının RAPD profilleri ile kontrol gruplarla karşılaştırıldığında görülen sayısal ve yoğunluk farklılıkları ile ve genomik kalıp kararlılık yüzdeleri hesaplanmıştır. Çalışılan 30 primerden yalnız 7'si ile kullanılabilir bantlar elde edilmiştir. RAPD profilinde polimorfik bantlar (OPB-20 ve OPG-10 primerleriyle elde edilen) şeklinde kendini gösteren hasarlı bölgelerin genomda bilinen bir gen olup olmadığının araştırılması için dizileme (SCAR analizi) aşamasında geçilmiştir. Polimorfik bantlar jelden uygun kitler aracılığı ile elde edilip bir vektörde klonlanmıştır. Klonlanan fragmanın dizi analizi 3700 ABI Prizm sekans cihazında gerçekleştirilmiştir. Elde edilen diziler benzerlik analizi için BLAST programında taranmıştır. RAPD primerine 10 bazın eklendiği toplam 20 nükleotitlik SCAR primeri tasarlanmış ve PCR gerçekleştirilmiştir. Sucul makrofitlerin tüm genomun çalışmadığı 2009'da elde edilen dizi mevcut veri tabanında bilinen bir gen bölgesi ile çakışmamıştır.

Noel ve Rath'ın (2006), *Mus musculus* ile *in vivo* yaptıkları çalışmada hayvanlar 24, 48, 72, 96, 120, 144 ve 168 saat sürelerle günlük 60 mg/kg EMS'ye, intraperitoneal

olarak günlük 60 mg/kg EMS'ye maruz bırakılmıştır. Uygulama sonunda elde edilen RAPD profillerinde uygulamanın 48. saatine kadar genetik hasarın oluşmadığını, ancak 72, 96, 120, 144ve 168 saatlik EMS maruziyeti olan gruplardan elde edilen bant profillerindeki değişimlerin olduğu bildirilmiştir. Bu değişimler uzun süren madde maruziyeti sonucu oluşan genetik hasar olarak yorumlanmıştır.

Uzonur ve arkadaşları (2007) tarafından çevresel kirliliğin *Mytilus galloprovincialis* türü miyde genomu üzerindeki etki incelenmiştir. Midyeler kirlilik oranı çoktan aza sıralanan; Marmara Denizi, Saroz Körfezi ve Ege Denizi'nden toplanmıştır. Her üç bölgen toplanan aynı tür midyelerden elde edilen DNA örneklerinin OPB-18 primeri ile yapılan PCR sonucu oluşturuldukları RAPD profilleri değerlendirilmiştir. Uygun bir model organizma seçimi ile sucul sistemde bioizleme çalışmaları için RAPD-PCR'ın ucuz, kolay ve faydalı bir yöntem olduğu bildirilmiştir.

Guida ve arkadaşlarının (2010) çevresel kirleticilerin genotoksik etkilerini dolaylı yoldan inceledikleri çalışmada da RAPD belirteçleri kullanılmıştır. Kirliliğe maruz kalan grup olarak şehrin çöplüğüne yakın yerleşim yerlerinde yaşayan; kontrol grubu olarak da böyle bir kirleticiden uzak nispeten temiz yerlerde yaşayan hamile kadınlardan alınan amniyon sıvısı *Paracentrotus lividus* embriyolarına uygulanmıştır. Kirleticilerle kontamine amniyon sıvısı uygulana embriyolarda kontrol grubuna göre farklı RAPD profilleri tespit edilmiş. Polimorfik bantlardan dizileme analizi yapıp BLAST veri tabanından kirleticileri hedefi olan bölge *Strongylocentrotus purpuratus* lösin zipper kinaz bölgesi ile %98 oranında benzerlik göstermiştir.

RAPD-PCR yöntemi için yapılan bir optimizasyon çalışmasında hastane atık suları içeren ortamda büyütülen soğanın (*Allium cepa*) kök meristem hücrelerinden elde edilen DNA'lar rastgele primerle çoğaltılarak elde edilen RAPD profilleri, temiz ortam yetiştirilen soğan kök meristem hücrelerinin RAPD bant profili karşılaştırılmıştır. Araştırmacılar RAPD yöntemini ekotoksikolojik çalışmalarda kullanışlı bir yöntem olarak rapor etmişlerdir (Szulc vd., 2012).

El-Nahas ve arkadaşları (2011) tarafından, genetiği değiştirilmiş (GD) Japon bildiricın eti tüketiminin toksik ve genotoksik etkilerinin belirlendiği çalışmada MN testi ile RAPD profilleri birlikte değerlendirilmiştir. Deney hayvanı olarak İsveç farelerinin kullanıldığı çalışmada GD et ürünü ile beslenen grupta RAPD profilleri kontrol grubuna göre farklı çıkmış ve MN verileriyle uyuşan bu sonuçlara dayanarak GD bildiricının genotoksik etkili olduğu bildirilmiştir.

Literatürde özellikle diğer genotoksisite test sistemleri kullanılarak antioksidan ve antigenotoksisite araştırmalarının da yapılabildiği görülmektedir. Antigenotoksisite araştırmalarında RAPD yöntemi de kullanılmıştır. Saad ve arkadaşları (2009), kemoterapik bir ajan olan cisplatinin sıçanlardalarda oluşturduğu genotoksik etkilere karşı reaktif oksijen süpürücü etkisi bilinen üzüm çekirdeği proantosiyanidin özünün koruyucu potansiyelini araştırdıkları çalışmada RAPD yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada kontrol gruplarının dışında sadece cisplatin uygulanan bir grup ve hem cisplantin hem de üzüm çekirdeği proantosiyanidin özünün uygulandığı gruplardan izole edilen DNA'lar 4 primer kullanılarak çoğaltılmış ve elde edilen RAPD profilleri değerlendirilmiştir. Cisplatinin genotoksik etki göstererek bant profillerini değiştirdiği, cisplatin ile üzüm çekirdeği proantosiyanidin özünün birlikte uygulandığı gruptaki bant profillerinin ise madde uygulanmayan kontrol grubunun RAPD profiline çok yakın olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla üzüm çekirdeği proantosiyanidin özünün DNA hasarına karşı koruyucu etkisi literatürle uyumlu olarak RAPD yöntemi ile de teyit edilmiştir.

Qari (2010) tarafından yapılan çalışmada *Costus speciosus* (hint baş zencefili) bitkisinin özütünün genotoksik ve antigenotoksik etkilerini araştırıldığı ilk olarak bir tür zencefil olan bu bitkinin özütünün *Allium cepa* kök meristem hücrelerinde herhangi bir genotoksik etki oluşturmadığı RAPD yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Antigenotoksik etkilerin araştırıldığı ikinci aşamada soğan bitkisi çalışma gruplarına ayrılmıştır. Bunlar madde uygulanmayan grup (kontrol), DNA hasarı oluşturduğu bilinen EMS ile muamele edilen grup; EMS ile birlikte *C. speciosus* özütü ile muamele edilen gruptur. 4 primerle kurulan PCR'lar ile yapılan bu çalışmada EMS ile birlikte zencefil bitki özütünün uygulandığı grubunu bant profilinin sadece EMS uygulana grubun aksine kontrol grubuna yakın bulunmuş ve *C. speciosus* özütü antigenoksik olarak bildirilmiştir.

Akgöl'ün (2010) yüksek lisan tezinde Sabinene'in insan periferik lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik maruziyet sonucu oluşturduğu genotoksik etkisi, RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA) metoduyla 10 primer kullanılarak belirlenmiştir. Sabinene'nin en yüksek doz ve uygulama süresinde kontrol ile karşılaştırıldığında farklı bantların oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir.

Büyükleyla'nın (2013) doktora tezinde sodyum metabisülfid 3 dozu 24 ve 48 saat sürelerle muamele edilen insan periferik lenfosit hücrelerinin genomik

DNA'sındaki olası genotoksik etkileri değerlendirmek için RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır. Uygulanan hem tüm doz ve sürelerde sodyum metabilsülfite genomik kalıp stabilitesini kontrol grubuna göre önemli oranda değiştirdiği tespit edilmiştir.

Benzo [a] piren, etil metan sülfanat ve mitomisin -C' nin genotoksik etkileri insan periferik lenfositlerinde RAPD tekniği kullanılarak araştırıldığı çalışmada maddelere maruz bırakılan hücrelerin RAPD profilleri ile kontrol grubu arasında bant yoğunluğu, bant artış ve azalışı gibi farklılıklar gözlenmiştir (Çulcu, 2007).

DNA onarımı, genomik kararsızlık ve apoptozis birbirleriyle etkileşen olaylar olduğundan, her biri karsinogenezde çok önemli role sahiptir (Ekmekçi vd., 2008). RAPD yöntemi kanser araştırmalarında da genomik değişikliklerin belirlenmesinde; malign hücrelerdeki genomik kararsızlıkları belirlemek için de fayda sağlar (Atienzar ve Jha, 2006).

Lösemi hastalarında RAPD-PCR yöntemi ile yapılan bir tarama çalışmasında rastgele seçilen primelerden OPA9 primeri ile belirlenen DNA polimorfizminin tanıda kullanılabilir nitelikte olduğu bildirilmiştir (Saleh, 2010).

Papadopoulos ve arkadaşları (2002) meme kanseri olan hastalarda RAPD-PCR tekniğini uygulamış ve kanserli hücrelerin profillerinde %44'lük bir farklılık tespit etmişlerdir.

Ong ve arkadaşlarının (1998) akciğer kanseri tanısı alan hastalarda genomik kararsızlığın belirlenmesi için 7 rastgele seçilen primerle yaptığı RAPD-PCR çalışmasında genomik kararsızlığın %15 ile %75 arasında değiştiği ama özellikle bir primerde bu yüzdenin 95'e kadar çıktığı belirlenmiştir. Neticede RAPD belirteçlerinin akciğer kanseri vakalarında genomik kararsızlığı belirlemede etkili olabileceği bildirilmiştir.

Misra ve arkadaşları (1998) beyin tümöründe genomik kararsızlığı RAPD profile kaybolan ve oluşan yeni bantların varlığıyla belirlemişlerdir. Singh ve Roy (2001) meme kanseri hücrelerinde 1270 bp'lik yeni bir bant oluşumunu tümör dokularının %81'in var olduğunu RAPD-PCR tekniği ile belirlemişlerdir.

Yapılan çalışmalarla cilt kanserlerindeki (Ribeiro vd.,2004) ve erkek çocuklarda doğumsal bir bozukluk olarak görülen hipospadiaslı hasta gruplarındaki (Alsulaimani vd., 2011) genomik kararsızlık da RAPD-PCR yöntemi ile başarılı bir şekilde tespit edilmiştir.

Kaptan'ın (2013) yaptığı tez çalışmasında kanserli hücre genomundaki kararsızlığın belirlenmesi RAPD-PCR tekniği uygulanmıştır. Meme ve endometrium kanserli hastaların parafine gömülü doku ve kan örneklerinden 6 farklı primer ile Yapılan PCR'lar sonrası elde edilen RAPD profilleri değerlendirilmiştir. Kullanılan primerlerden OPA9'un kanserli hücrelerde normal hücrelere kıyasla farklı RADP profilleri oluşturduğu, RAPD yönteminin kanserli hücrelerde genomik kararsızlığın tespitinde etkili bir test sistemi olduğu bildirilmiştir.

2. MATERYAL METOD

2.1. Materyal

Paraben ve türevlerinin genotoksik etkilerini incelemek amacıyla yapılan bu *in vitro* çalışmada insan periferik kan kültürü ve izole lenfositler kullanılmıştır. Kullanılan periferik kan, alkol, sigara ve sürekli ilaç kullanmayan, sağlıklı iki donörden temin edilmiştir.

2.1.1. Kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar

Santrifüj, floresan mikroskop, inkübatör, pH metre, su banyosu, flow kabin, buzdolabı, hassas terazi, falcon tüp, mikropipet, enjektör, lam, lamel, erlen, beher, yatay ve dikey şale, elektroforez tankı, 1.5 ml ependorf tüpü, jel görüntüle sistemi, mikrodalga fırın, nano-drop spektrometre.

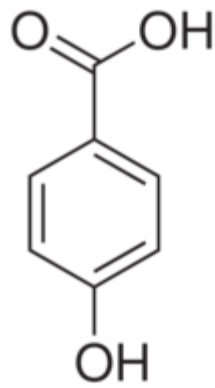
Kromozom medyum (Biochrom), Histopaque 1077 (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), DMSO, NaCl, KCl, NaOH, , Etidyum Bromide, Triton-X 100, EDTA, Trizma Base (Sigma), HMA (Sigma), LMA (Sigma), Fosfat tampon (PBS) tabletleri, fenol-kloroform, SDS, proteinaz K, etanol (saf), borik asit, trypan blue, H₂O₂, EMS, dNTP mix, (sigma), MgCl₂ (sigma), 10 X Taq Polimeraz (sigma), 6X Loading Dye Solution (Fermentas), Oligonükeotid primerler (Biolegio, Research Genetics).

Kullanılan 10 nükleotidlik primerlerin 5'→3' yönündeki nükleotid sıraları, her bir primerin G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklığı tablo 2.1'de gösterilmiştir.

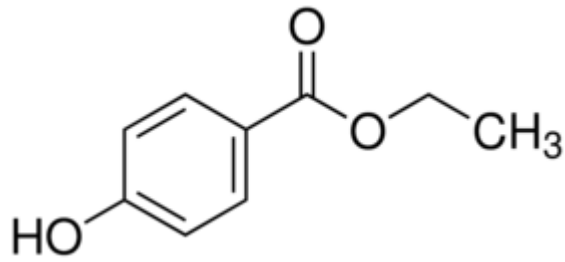
Tablo 2.1. PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri, G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklıkları

Primerler	Primer dizisi (5'→3')	G+C Yüzdesi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
PM6	GGTGACGCAG	70	34
PM7	GGGTAACGCC	70	34
OPA 2	TGCCGAGCTG	70	34
PM1	GTCCCGACGA	70	34
PM2	ACCGCGAAGG	70	34
PM3	TGCGCCCTTC	70	34
PM5	AGGGCGTAAG	60	32
PM8	CCCGTCAGCA	70	34
PM10	CTGCGCTGGA	70	34
OPA 5	AATCGGGCTG	60	32

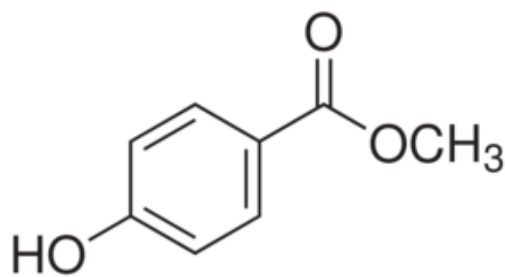
Genotoksik etkileri değerlendirilen kimyasallar ve açık formülleri aşağıdaki Şekil 2.1-7'de verilmiştir.



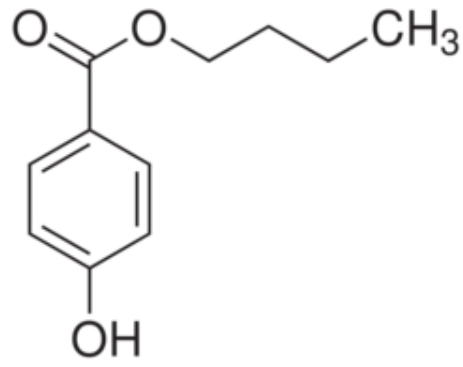
Şekil 2.1. *Paraben (4-Hydroxybenzoic acid)*



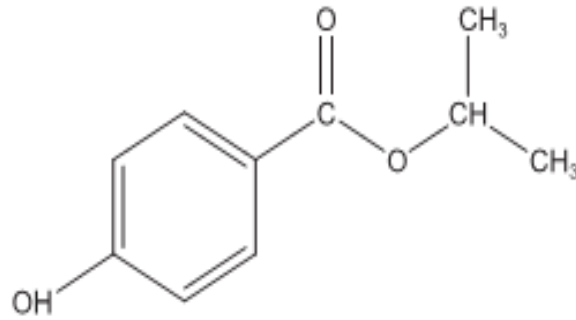
Şekil 2.2. *Etil paraben (Ethyl 4-hydroxybenzoate)*



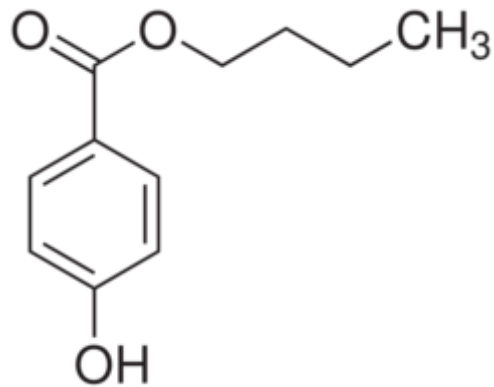
Şekil 2.3. *Metil paraben (Methyl 4-hydroxybenzoate)*



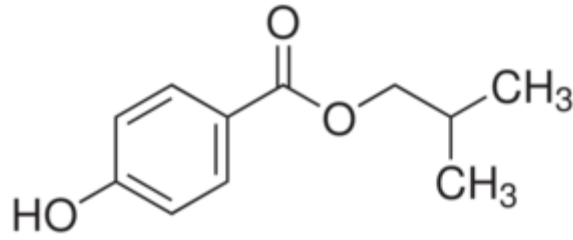
Şekil 2.4. Propil paraben (Propyl4-hydroxybenzoate)



Şekil 2.5. İzopropil paraben (Isopropyl 4-hydroxybenzoate)



Şekil 2.6. Bütil paraben(Butyl4-hydroxybenzoate)



Şekil 2.7. İzobütil paraben (Isobutyl 4-hydroxybenzoate)

2.1.2. Comet testinde kullanılan solüsyonlar

Fosfat tamponu (PBS)

1 tane PBS tableti 200 ml distile suda çözülür ve +4° C’de saklanır.

Lizis çözeltisi

NaCl	146,1 g	}	900 ml dH ₂ O pH= 10
EDTA.....	37,2 g		
Tris.....	1.2 g		

Hazırlanan stok lizis tercihen koyu renkli şişede +4° C’de koyu renkli şişede saklanır. Deneyden önce her 100 ml çözelti için 1 mL Triton X ve 10 mL DMSO ilave edilir.

Elektroforez tamponu

Na ₂ EDTA	0,747g	}	2lt dH ₂ O
NaOH	24g		pH > 13
+4° C’de saklanır.			

Nötralizasyon tamponu

Tris.....	4,8456 g	}	pH= 7.5
+4° C’de saklanır.			

Düşük erime ısıli agaroz jel

0,07 gr düşük erime ısıli agar

10 ml PBS

Boyama çözeltisi

5mg EtBr ve 50ml dH₂O ile stok çözelti hazırlanır. +4° C’de saklanır. Boyama yapılacağı zaman 1:4 oranında distile su ile dilüsyon yapılır.

Lamların agaroz ile kaplanması

0,75g yüksek erime ısılı agaroz 100ml dH₂O’da çözülür. Lamlar rodajlı kısmının yarısına kadar agarozla batırılır. Altları silinerek kurumaya bırakılır. Kuruduktan sonra numaralandırma yapılarak çalışma evvelinde hazır hale getirilir.

2.1.3. RAPD-PCR yönteminde kullanılan solüsyonlar

Stok Tris Çözeltisi:

500mM Tris pH: 8.0 'e HCl ile ayarlanır.

Stok EDTA çözeltisi:

500mM EDTA (Etilendiamin –tetra asetik asit disodyum tuzu), 5M NaOH (Sodyum Hidroksit) ile pH:8.0 'e ayarlanır.

TBE tamponu:

54 g Trisma base

27,5 g Borik Asit

20 ml 0,5 M EDTA



800 ml distile suda çözülür, 1000 ml’ye tamamlanır

2.2. Metod

2.2.1. Kan örneklerinin alınması

Alkol, sigara ve sürekli ilaç kullanmayan, sağlıklı 25-30 yaşlarında iki donörden steril şartlarda heparinize olarak alınan kan alınmıştır.

2.2.2. Comet testi

Genotoksisite tespitinde kullanılan comet testinde DNA hasar göstergesi DNA zincir kırıklarıdır. Apoptozdan kaynaklanan DNA fragmentasyonun sonuçları etkilememesi için comet testi yapılacak hücrelerde madde uygulaması sonucu en az

%80 canlılık oranının bulunduğu dozların tercih edilmesi gerekmektedir. Bunun için lenfositler izole edildikten sonra comet testi için uygulanabilir dozların seçimi için tripan mavisi testi yapılmıştır.

2.2.2.1. Lenfosit izolasyonu, madde uygulaması ve doz taraması

1. 12ml'lik falkona Histopaque 1077 ve üzerine de eşit miktarda kan eklenir. 400g.'de 30 dakika santrifüj yapılır.
2. Santrifüj sonrası lenfosit tabakası dikkatlice toplanıp yeni bir falkona alınır.
3. Lenfositlerin üzerine 6 ml PBS eklenerek 250g.'de 10 dakika santrifüj yapılır.
4. Santrifüj sonrası süpernatant çekilerek üzerine 3 ml PBS eklenir, pipetaj yapılır ve 250g.'de 10 dakika santrifüj yapılır.
5. Yıkama aşaması olan 4. basamak tekrarlanır.
6. Santrifüj sonrası lenfositler 1ml RPMI 1640 eklenerek dilüe edilir.

Yapılan literatür araştırması sonucu test maddelerinin denenecek doz aralığı 50 µg/ml ile 1000 µg/ml olarak belirlenmiştir. Paraben ve türevleri DMSO'da çözülmüştür. Dolayısıyla çalışmamızda spontan ve 50 µM'lık H₂O₂ pozitif kontrol dışında DMSO kontrolü de bulunmaktadır.

Madde maruziyeti için 1ml'lik ependorf tüplere ;

150 µl RPMI 1640 içinde dilüe edilen lenfosit,

95 µl RPMI 1640,

5 µl madde

eklenerek 37° C'de 1 saatlik inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası lenfositlerde canlılık tespiti için tripan mavisi testi yapılmıştır.

2.2.2.2. Tripan mavisi ile canlılık testi

Lenfosit hücrelerinde canlılık tespitinde yaygın olarak kullanılan negatif yüklü bir boya olan tripan mavisi hücre membranı zarar görmüş canlı olmayan hücreler tarafından absorblanır ve mikroskop altındaki incelemede ölü hücreler mavi ile boyanmış olarak canlı hücrelerden kolaylıkla ayırılabilirler.

Hücre süspansiyonu 1:1 oranında %0,4'lük tripan mavisi boyası ile seyreltilip ve bu seyreltilen süspansiyondan alınıp thoma lamına yayılmış ve ışık mikroskopu altında hücreler sayılmıştır. Canlı hücre yüzdesi aşağıda gösterilen şekilde hesaplanmıştır.

$$\text{Canlı Hücre (\%)} = (\text{Canlı Hücre} / \text{Toplam Hücre}) \times 100$$

Her test maddesi için 1 saatlik maruziyet sonrası %80'den fazla canlılığın olduğu en yüksek doz ilk doz kabul edilip diğer üç doz bir öncekinin yarısı olacak şekilde hesaplanmıştır.

2.2.2.3. İzole lenfositlerde comet yöntemi uygulaması

Histopaque 1077 kullanılarak izole edilen lenfosit hücreleri paraben ve türevlerinin belirlenen dozları ile 37° C'de 1 saat inkübe edildikten sonra lenfositler, düşük erime ısıları agarla karıştırılmış ve önceden yüksek erime ısıları agarla kaplanan lamlara yayılıp lameller kapatılmış +4°C'de lam üzerinde bir tabak oluşturmalarına olanak sağlanmıştır. 20 dakika sonra buzdolabından çıkarılan lamaların üzerinden dikkatlice lameller kaldırılmış, içerisinde soğuk liz solüsyonu bulunduran ve ışıktan etkilenmemesi için folyo ile sarılı şalelere dizilmiştir. Hücreler +4°C'de 1 gece lize bırakılmıştır.

Ertesi gün lizis solüsyonundan çıkarılan lamalar comet elektroforez tankına dizilmiş alkali elektroforez tamponu içinde DNA denatürasyonu için 20 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda özel comet tankında soğuk ve karanlık bir ortamda 25 Volt; 300 Amper; 25 dakika süren elektroforez gerçekleştirilir. Lizis ile serbestleşen DNA ışığa karşı duyarlı olduğundan madde uygulaması dışında ilave kırıklar oluşmaması için işlemlerin karanlık ortamda gerçekleştirilmesi önemlidir. Yürütme işlemi bitiminde tanktan çıkarılan lamalar soğuk nötralizasyon çözeltisinde karanlıkta 5 dakika bekletildikten sonra soğuk suya daldırılıp çıkarılma üzere yıkanmış ve serin karanlık bir ortamda kurutulmuştur.

Tamamen kuruyan lamalar EtBr ile boyanıp floresan mikroskopunda incelenerek her lamdan rastgele 50 görüntü (iki donörden toplamda 100 hücre görüntüsü olacak şekilde) 40X büyütmede fotoğraflanarak arşivlenmiştir.

Analizler aynı kişi tarafından Comet Görüntü İşleme ve Analiz Programı Sistemi Programı (BAB Bs 200 Pro) kullanılarak yapılmıştır.

Program bir analizde 21 parametreye göre sonuçlar verebilmektedir. Çalışmada ise yaygın kullanılan parametrelerden DNA hasarı ile doğru orantılı olarak artan kuyruk uzunluğu (μm) değerlendirilmiştir.

2.2.2.4. İstatistik

Çalışmamızda uygulama gruplarının sonuçları spontan ile karşılaştırılmak suretiyle SPSS 21 programında Dunnet t test kullanılarak istatistiksel açıdan anlamlılıkları belirlenmiştir.

2.2.3. RAPD- PCR yöntemi

RAPD-PCR yönteminde paraben ve türevlerinin 24 ve 48 saatlik uygulamalarının kültüre edilen insan lenfosit DNA'sı üzerine etkileri araştırılmıştır. Toplam 72 saatlik lenfosit hücre kültürü tamamlandıktan sonra ilk olarak kültüre edilen hücrelerden DNA izolasyonu, sonra RAPD primerleri ile PCR'ları yapılmış ve son olarak da elde edilen PCR ürünleri elektroforezle yürütölüp görüntülenmesi yapılarak elde edilen RAPD profilleri değerlendirilmiştir.

2.2.3.1. Lenfosit kültürü ve madde uygulaması

Alkol, sigara ve sürekli ilaç kullanmayan, sağlıklı iki donörden steril şartlarda heparinize olarak alınan kan, 5ml Kromozom Medyum-B bulunan tüplere, 12' şer damla (0,2 ml) ilave edilerek ve steril koşullara sahip, 37 oC de, toplam 72 saat inkübe edilmiştir.

İnsan periferik lenfositleri 24 ve 48 saat boyunca parabenin 500, 250, 100 ve 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ve paraben türevlerinin 100, 50, 25 ve 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'lik dozlarıyla muamele edilmiştir. Kan hücreleri medyum içerisindeyken 24 saatlik muamele için kültürün 48. saatinde; 48 saatlik muamele için kültürün 24. saatinde tüplere test maddeleri eklenerek toplam 72 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır.

2.2.3.2. Lenfosit kültüründeki besi yerinin uzaklaştırılması

Kültür süresinin bittiği 72. saatte her bir tüp 1200 rpm’de 15 dakika santrifüj edilip, santrifüj sonrası süpernatant atılmıştır. Tüplere 1ml PBS ilave edilip hafifçe vortekslendikten sonra ve 1200 rpm’de 15 dakikalık bir santrifüj daha yapılmış ve süpernatant atılmıştır. Böylece ortamdaki besi yeri uzaklaştırılmıştır. Tüpün dibindeki hücrelerin üzerine 300 µl PBS eklenmiştir.

2.2.3.3. Lenfositlerden DNA izolasyonu

PBS’li hücre süspansiyonundan 250 µl alıp üzerine 500 µl liziz buffer (%10 SDS, 1 M NaCl, 10 mg/ml Proteinaz K, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH: 8,0) ilave edilerek vortekslenip 37°C de bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası örnek üzerine eşit hacim fenol-kloroform eklenerek 2500 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiş ve üstteki berrak faz yeni steril DNA tüplerine alınmıştır. Bu aşama üst faz berraklaşana kadar 2 ya da 3 kez tekrar edilmiştir. Üzerine 1 ml absolute etil alkol eklenen tüpler 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak alkol uzaklaştırıldıktan sonra işlem %70’lik etil alkol ile tekrarlanmıştır. Pelet steril koşullarda kurutulduktan sonra 30 µl steril distile suda çözülmüştür.

2.2.3.4. DNA konsantrasyon ve kalite tayini

Araştırmada elde edilen DNA örneklerinde miktar ve kalite tayini Nanodrop ND–1000 spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonunu 260nm.’deki absorbans değerinde ng /µl cinsinden veren Nanodrop cihazında 260/280 nm’lerdeki absorbans oranı DNA/RNA’nın saflık derecesini göstermektedir. İdeal şartlarda saf DNA örnekleri için bu oranın 1,8 olması beklenmektedir.

DNA miktarını değerlendirirken spektrometrik ölçümleri teyit amacıyla %0,8’lik agaroz jelde 100 V akım hızıyla 40 dakika elektroforezde yürütülen örnekler UV altında görüntülenmiştir.

İzole edilen DNA örneklerinden;

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

formülü kullanılarak son konsantrasyon 2 ng/µL olacak şekilde steril distile su ile dilüsyonlar yapılmıştır.

2.2.3.5. RAPD-PCR reaksiyonu

Son dilüsyonu yapılan DNA örnekleri ile tabloda baz dizilimleri ve %G+C oranları verilen rasgele seçilmiş primerlerin her biri ile PCR reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için örnekler 0,5 ml propilen tüplerde dH₂O; 10x Taq Buffer; MgCl₂ (25 mM); dNTP mix (2 mM); Primer (5 pmol) ve DNA (2 ng/μL) kullanılarak flow kabinde buz üzerinde hazırlanmıştır.

Hazırlanan DNA örneklerinin amplifikasyonu ThermalCycler cihazında Tablo 2.2.'de belirtilen sıcaklık, süre ve döngülerde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 2.2. Uygulanan PCR Programı

İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön denatürasyon	95	5 sn	1
Denatürasyon	92	55 sn	40
Primer bağlanma	33-34	1 dk	
Uzama	72	2 dk	
Son uzama	72	7 dk	1
Soğutma	4	∞	

2.2.3.6. Agaroz jel elektroforezi

PCR örneklerinin yürütülmesi için 0,5 X TBE çözeltisi ile hazırlanan %1,8'lik agaroz jel ve yatay konumda elektroforez kullanılmıştır. Jeller etidyum bromür (5 μg/ml) ile boyanmıştır. PCR örneklerinden 10 μL alınıp 3 μL 6X DNA loading dye ile karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Her bir jele eş zamanlı olarak DNA katılmamış negatif kontrol ile birlikte muamele edilmiş örneklerin DNA'ları ve 100 bp'lik DNA markırı da yüklenmiştir. PCR ürünleri 150 voltta 1 saat yürütülmüştür.

2.2.3.7. PCR Ürünlerinin jelde görüntülenmesi

Jeller UV translüminatör üzerinde görüntülenmiştir. Jellerin fotoğrafları Uvitec Biolab UV Photomer jel dökümantasyon cihazıyla çekilmiştir.

2.2.3.8. Elde edilen RAPD profillerinin değerlendirilmesi

Elde edilen RAPD profillerinde test grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak oluşan yeni bantlar ve kaybolan bantlar için skorelama yapılmıştır. Skorelama yapılırken örneklerin RAPD profilindeki gözlenen her farklılık (bant kaybı ya da yeni bir bant oluşumu) “1” olarak hesaplanmış, farklılığın gözlenmediği profil “0” olarak değerlendirilmiştir.

3. BULGULAR

3. 1. Comet Testi Sonuçları

Comet testinde genotoksik hasarın sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilmesi için madde uygulamasında hücrelerin canlılık yüzdesinin en az %80 olduğu dozlar tripan mavisi testi ile belirlenmiştir. Değerlendirilmesi planlanan doz aralığında her test maddesi için 1 saatlik maruziyet sonrası %80’den fazla canlılığın olduğu en yüksek doz ilk doz kabul edilip diğer üç doz bir öncekinin yarısı olacak şekilde hesaplanmıştır ve konsantrasyonlar Tablo 3.1’deki gibi belirlenmiştir.

Tablo 3.1. *Test Maddelerinin Comet Testinde Uygulanacak Dozları*

Test Maddesi	Comet Testinde Uygulanacak Dozlar (µg/ml)			
Paraben	1000	750	500	250
Metil P.	750	500	250	125
Etil P.	500	250	125	50
Propil P.	250	125	50	25
İsopropil P.	250	125	50	25
Bütil P.	125	50	25	10
İsobütil P.	125	50	25	10

Paraben ve türevleri için yapılan literatür taramasında uygulanacak dozlarda üst sınır 1000 µg/ml olarak belirlenmiştir. 1 saatlik uygulama sonucunda sitotoksosite potansiyellerindeki farklılık comet testinde uygulanacak dozların da buna paralel olarak farklı belirlenmesini gerektirmiştir. 1000 µg/ml’lik dozda sadece paraben için %80’den fazla canlılığın olduğu; alkil zincir uzadıkça belirlenen en yüksek dozun düştüğü tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre sitotoksosite potansiyeli açısından isobütil ve isobütil paraben> isopropil ve propil paraben > etil paraben > metil paraben > paraben şeklinde bir sıralama yapılabilir.

Tablo 3.2. *Parben Ve Türevlerine 1 Saatlik Maruziyet Sonucunda İnsan Lenfositlerinde Oluşan Ortalama Kuyruk Uzunluğu*

Test Maddesi	Doz (µg/ml)	Ortalama kuyruk uzunluğu (µm) ±SD
Spontan		4,19 ±0,32
DMSO	20 µl/ml	4,32±0,24
H2O2	50 µM	43,88±0,14*
Paraben	125	4,34±0,26
	250	4,89±0,19
	500	5,62±1,24
	1000	10,93±0,91*
Metil Paraben	125	7,48±1,84
	250	6,52±0,43
	500	11,98±1,20*
	750	17,18±1,62*
Etil Paraben	50	6,80±0,92*
	125	7,56±0,05*
	250	7,60±0,09*
	500	11,24±0,25*
Propil Paraben	25	5,70±0,13
	50	18,37±0,90*
	125	17,63±1,79*
	250	31,99±0,88*
İzopropil Paraben	25	7,93±0,02*
	50	9,42±1,30*
	125	15,02±0,38*
	250	19,62±1,13*
Bütil Paraben	10	5,24±0,25
	25	6,94±0,36*
	50	7,59±0,10*
	125	27,59±1,08*
İzobütil Paraben	10	5,93±0,22
	25	6,10±0,36
	50	8,69±0,04*
	125	30,31±1,61*

* Kontrole göre $p \leq 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

Comet testinde DNA hasarı arttıkça kırılmalara bağlı olarak kuyruk uzunluğu artmaktadır. Parben ve türevleri ile 1 saatlik maruziyet sonucunda insan lenfositlerinde oluşan ortalama kuyruk uzunluğu Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Test maddelerimizin çözücüsü olan DMSO’nun spontana çok yakın kuyruk uzunluğu değeri ile kullanılan dozda genotoksik olmadığı tespit edilmiştir. Paraben ve türevlerinin, kuyruk uzunluğunu spontana göre tüm dozlarda ve genel olarak doza bağlı olarak arttırdığı görülmüştür. Bununla birlikte paraben için bu artış en yüksek doz olan 1000 µg/ml’lik uygulamada istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Metil parabende

en yüksek iki doz olan 750 ve 500 µg/ml’lik dozlarda istatistiki olarak anlamlı sonuçlar elde edilmişken, etil parabenin tüm dozlarında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Etil parabenin tüm dozlarının oluşturduğu kuyruk uzunlukları istatistiki olarak anlamlı çıkmıştır. Propil parabenin 50 µg/ml’lik dozu bir üst doz olan 125 µg/ml’lik dozdan çok az farkla daha fazla kuyruk uzunluğuna sebep olarak paraben ve türevleri içinde doz cevap ilişkisinde paralellliğini bozmuş gibi görünmekle birlikte iki dozun oluşturdukları kuyruk uzunlukları birbirine yakındır ve istatistiki olarak en düşük doz hariç 50, 125 ve 250 µg/ml’lik diğer dozlarda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Propil paraben ile aynı dozlarda uygulanan İzopropil parabenin doza bağlı kuyruk uzunluğunu artırdığı görülmüş ve tüm dozlarında istatistiki olarak anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Bütil paraben ve izobütil paraben’in daha düşük başlangıç dozları olmalarına rağmen paraben ve türevleri içerisinde en uzun kuyruk uzunluklarına sebep oldukları ve dolayısıyla daha fazla DNA hasarına sebep oldukları görülmüştür. Bütil parabenin 25, 50 ve 125 µg/ml’lik dozlarında, izobütil parabenin ise 50 ve 125 µg/ml’lik dozlarında istatistiki anlamlılık tespit edilmiştir.

Comet testi için maddelerin genotoksisite potansiyellerini karşılaştırırken uygulanan dozların farklı olduğu hesaba katıldığında hepsi için ortak doz olan 125 µg/ml’lik dozunda DNA hasar göstergesi olan en yüksek kuyruk uzunluğunu izobütil ve bütil parabenin oluşturduğu sonra sırayla; propil ve izopropil paraben, etil paraben, metil paraben ve paraben’in oluşturduğu görülmektedir. Sitotoksitesi ile paralel olarak alkil zincir arttıkça genotoksisite potansiyelinin de arttığı söylenebilir.

3.2. RAPD-PCR

Maruziyet sürelerinin bitiminde kültürden izole edilen DNA’ların amplifikasyonu için 10 primer kullanılmış ancak tüm maddeler için amplifikasyona üç primer ile devam edilmiştir. Çünkü kullanılan bu primerlerden bir kısmı ile amplifikasyon gerçekleşmemiş bazıları ise RAPD-PCR test sisteminde genotoksiteleri belirlemede kullanışsız bantlar vermiştir.

Kullanılan 10 nükleotidlik primerlerin 5’→3’ yönündeki nükleotid sıraları, her bir primerin G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklığı tablo 3’ te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. *PCR amplifikasyonu için kullanılan primerlerin nükleotid dizileri, G+C yüzdesi ve bağlanma sıcaklıkları*

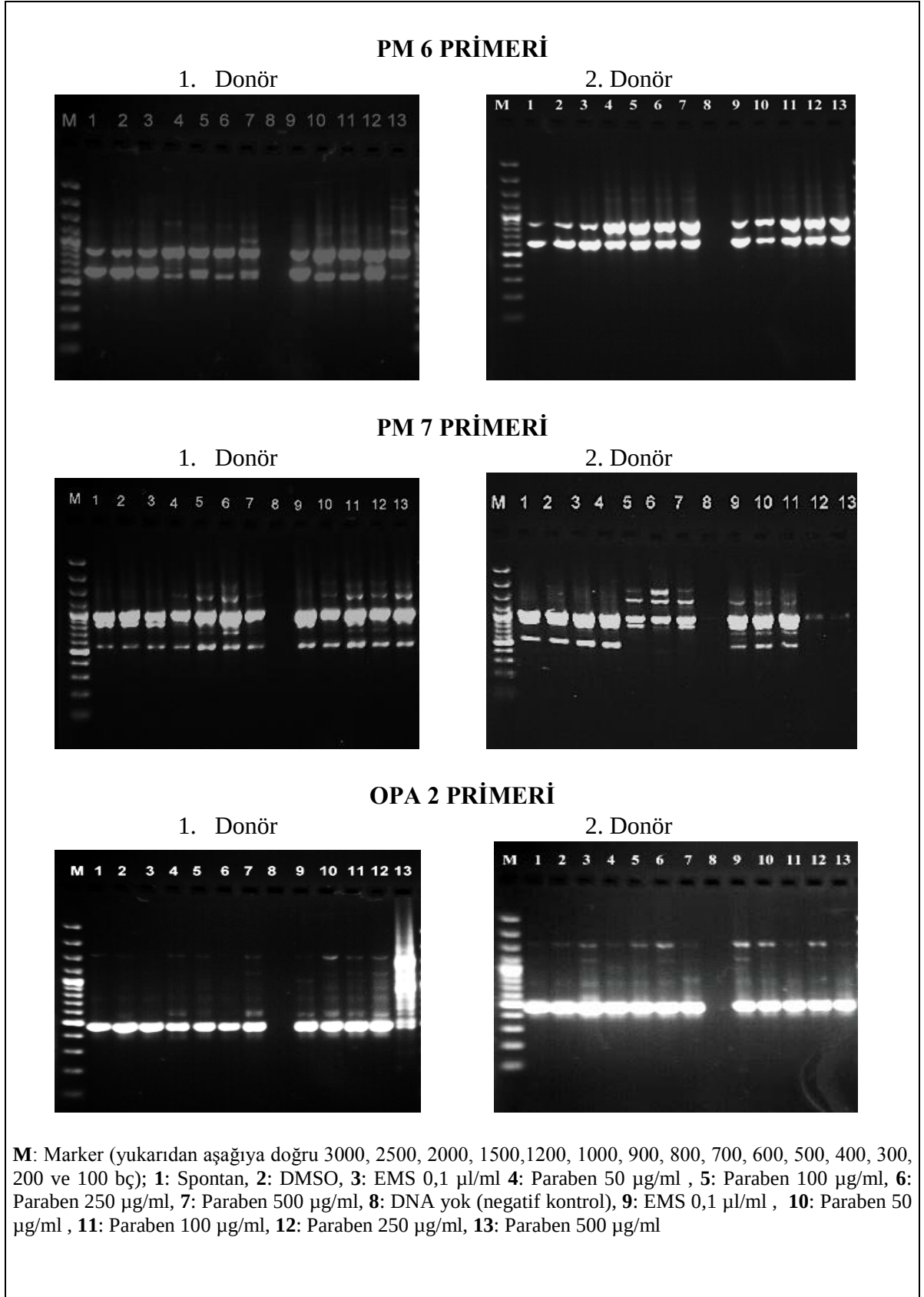
Primerler	Primer dizisi (5'→3')	G+C Yüzdesi	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
PM6	GGTGACGCAG	70	34
PM7	GGGTAACGCC	70	34
OPA 2	TGCCGAGCTG	70	34

Seçilen primerlerle ile gerçekleştirilen PCR'lar neticesinde sponton ve negatif kontrol örneklerinin RAPD profillerinde PM6 primeri ile yaklaşık 600 ile 900 bp büyüklüğünde iki bant; PM7 primeri ile yaklaşık 550, 850 ve 1000 bp büyüklüğünde üç bant; OPA2 primeri ile ise yaklaşık 450 ve 1600 bp büyüklüğünde iki bant elde edilmiştir (Şekil 3.1.-3.7).

Kültüre edilmiş lenfositler hücrelerinde paraben ve esterleri ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant profilleri karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Kontrol grubu profiline göre test maddesi muameleli grupların profillerinde oluşan her yeni bant ve kaybolan bant için 1 değeri verilerek polimorfik bant sayıları tablolarda (Tablo 3.4.- 3.10) verilmiştir. Paraben ve esterlerine maruz bırakılan lenfosit kültürlerinin seçilen primerlerle yapılan PCR'ları sonucu polimorfik bantlar ürettikleri yani paraben ve esterlerinin maruziyetinin genetik hasar oluşturarak genomik stabiliteyi etkiledikleri tespit edilmiştir.

3.2.1. Paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları

Parabenin 50- 500 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant profilleri şekil 3.1'de polimorfik bant sayıları ise tablo 3.4'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. 24 ve 48 saatlik paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri

Tablo 3.4. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	50 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	50 µg/ml	125 µg/ml	250 µg/ml	500 µg/ml
1. Donör RAPD profili	PM6	2	0	2	1	1	2	0	2	0	0	3
	PM7	3	0	1	2	2	1	0	2	2	2	1
	OPA2	2	1	1	0	1	2	2	1	2	2	-
2. Donör RAPD profili	PM6	2	0	2	2	2	1	0	2	2	2	2
	PM7	3	0	0	3	3	1	2	2	2	2	2
	OPA2	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde parabenin 50 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 550 ve 1350bç büyüklüğünde iki yeni bant; 125 ve 250 µg/ml'lik dozlarında 1350 bç büyüklüğünde bir yeni bant; 500 µg/ml'lik dozunda ise 1350 ve 1000 bç büyüklüğünde iki yeni bant olduğu görülmüştür. Ayrıca 250 µg/ml'lik paraben dozunda 600 bç büyüklüğündeki bantın yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. İlk donörün 48 saatlik maruziyet sonucu dozların RAPD profilleri değerlendirildiğinde 50 µg/ml'lik paraben dozunda 1200 ve 1350 bç büyüklüğünde iki yeni bant; 500 µg/ml'lik dozunda ise 1350, 2000 ve 2200 bç büyüklüğünde 3 yeni bant olduğu görülmüştür. 48 saatlik 250 µg/ml paraben maruziyetinde de 600 bç büyüklüğündeki bantın yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. İkinci donörün 24 ve 48 saatlik paraben maruziyetinde uygulanan tüm dozların profillerinde 1350 ve 1550 bç büyüklüğünde iki yeni bant olduğu görülmüştür.

PM7 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1000, 850 ve 550 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyette parabenin 50 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 1350bç büyüklüğünde bir yeni bant; 125 ve 250 µg/ml'lik dozlarında 700 ve 1350 bç büyüklüğünde iki yeni bant; 500 µg/ml'lik dozunda ise 1350 bç büyüklüğünde bir yeni bant olduğu, 850 bç büyüklüğündeki bantın ise kaybolduğu görülmüştür. İlk donörün 48 saatlik maruziyet

sonucu dozların RAPD profilleri değerlendirildiğinde 50 µg/ml’lik paraben dozunda 1350 bç büyüklüğünde bir yeni bant oluştuğu, 850 bç’lik bantın kaybolduğu; ; 125 ve 250 µg/ml’lik dozlarında 700 ve 1350 bç büyüklüğünde iki yeni bant; 500 µg/ml’lik dozunda ise 1350bç büyüklüğünde 1 yeni bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatli 100, 250 ve 500 µg/ml’lik paraben maruziyetinde 1350 ve 1550 bç’lik iki yeni bant oluştuğu ve 600 bç’lik bantın kaybolduğu görülmüştür. 48 saatlik 50 ve 125 µg/ml’lik paraben maruziyetinde 1350 ve 700 bç’lik iki yeni bant oluştuğu; 250 ve 500 µg/ml’lik paraben dozlarında ise 600 ve 1000bç’lik iki bantın kaybolduğu görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR’lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1550 ve 450 bç’lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyette parabenin 50 µg/ml’lik dozunda yaklaşık 600 bç büyüklüğünde bir yeni bant oluştuğu; 250 µg/ml’lik dozunda 1550 bç büyüklüğündeki bantın kaybolduğu; 500 µg/ml’lik dozunda ise 1250 ve 600 bç büyüklüğünde iki yeni bant oluştuğu görülmüştür. İlk donörün 48 saatlik maruziyet sonucu dozların RAPD profilleri değerlendirildiğinde 50 µg/ml’lik paraben dozunda 600 bç büyüklüğünde bir yeni bant oluştuğu, 125 ve 250 µg/ml’lik dozlarında 1250 ve 600 bç büyüklüğünde iki yeni bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 500 µg/ml’lik paraben maruziyetinde 1250 bç’lik bir yeni bant oluştuğu; 48 saatlik 500 µg/ml paraben maruziyetinde ise 1600 bç’lik bantın kaybolduğu görülmüştür.

3.2.2. Metil Paraben uygulanan örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları

Metil parabenin 10- 100 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant profilleri şekil 3.2’de polimorfik bant sayıları ise tablo 3.5’de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve Metil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1. Donör RAPD profili	PM6	2	0	0	1	1	2	0	0	0	1	1
	PM7	3	0	2	2	2	1	0	2	2	2	2
	OPA2	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	3
2. Donör RAPD profili	PM6	2	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1
	PM7	3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
	OPA2	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

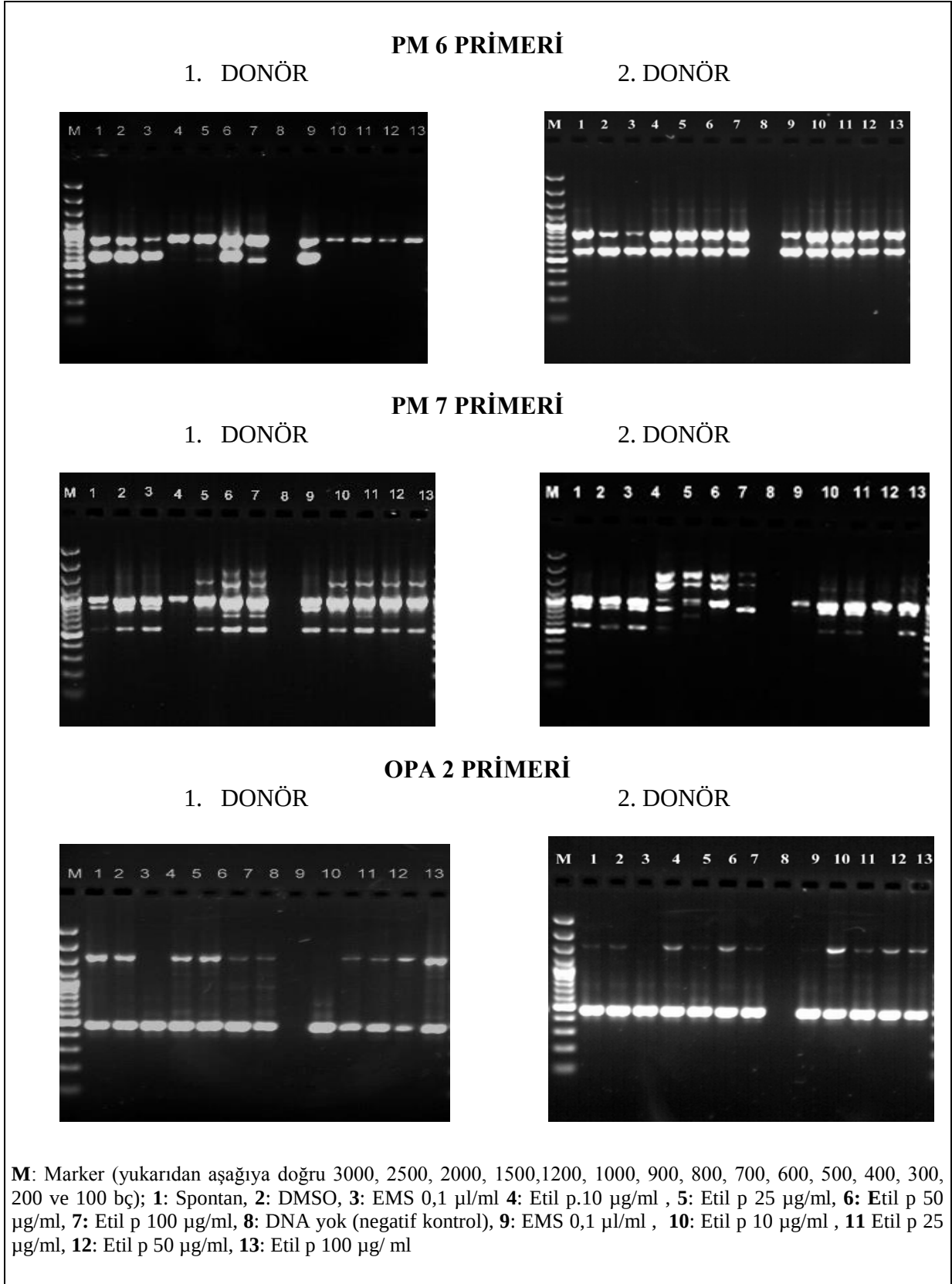
PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde metil parabenin 25 ve 50 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 1250 bç büyüklüğünde yeni birer bant oluştuğu görülmüştür. İlk donörün 48 saatlik maruziyet sonucu dozların RAPD profilleri değerlendirildiğinde 10 µg/ml'lik dozda 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma olduğu; 50 µg/ml'lik dozda 600 bç'lik bantın kaybolduğu; 100 µg/ml'lik dozunda ise 500 bç büyüklüğünde bir yeni bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik metil paraben maruziyetinde uygulanan tüm dozların profillerinde 1350 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu; 48 saatlik uygulamalarda ise 50 µg/ml'lik dozda 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma; 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarda ise 1350 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu görülmüştür.

PM7 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 550, 850 ve 1000 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 ve 48 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde metil parabenin tüm dozlarında yaklaşık 1350 ve 700 bç büyüklüğünde yeni iki bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 50 µg/ml metil paraben maruziyeti sonunda RAPD profilinde 1250 bç'lik yeni bir bantın oluştuğu; 48 saatlik tüm metil paraben uygulamalarda ise 1250 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1600 ve 450 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyette metil parabenin 10 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 700 bç büyüklüğünde; 25 µg/ml'lik dozunda 900 bç büyüklüğünde 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarında ise 600 bç büyüklüğünde birer yeni bant oluştuğu görülmüştür. İlk donörün 48 saatlik maruziyet sonucu dozların RAPD profilleri değerlendirildiğinde 10 µg/ml'lik paraben dozunda 1600 bç'lik bant kaybolduğu; 25 µg/ml'lik dozunda 600 ve 1200 bç büyüklüğünde iki yeni bant; 50 µg/ml'lik metil 700 bç büyüklüğünde yeni bir bant; 100 µg/ml'lik dozunda ise 1200, 100 ve 600 bç'lik üç yeni bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörde sadece 48 saatlik 50 µg/ml metil paraben uygulamasında 1600 bç'lik bantın kaybolduğu ve tek dozda polimorfizm oluştuğu görülmüştür.

3.2.3. Etil Paraben Uygulanan Örneklerin PM 6, PM 7, ve OPA 2 Primerleri İle Gerçekleştirilen RAPD-PCR Sonuçları

Etil parabenin 10- 100 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant porfilleri şekil 3.3'de polimorfik bant sayıları ise tablo 3.6.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. 24 ve 48 saatlik etil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri

Tablo 3.6. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve etil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1.Donör RAPD profil	PM6	2	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
	PM7	3	0	2	1	3	3	0	1	2	2	1
	OPA2	2	1	2	2	1	2	3	0	0	0	2
2.Donör RAPD profil	PM6	2	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1
	PM7	3	0	2	4	3	4	1	1	1	1	1
	OPA2	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde etil parabenin 10 ve 25 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 600 bç büyüklüğündeki bantın yoğunluğunda belirgin azalma görülmüştür. 48 saatlik etil paraben uygulamasında tüm dozlarda dozda 600 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür. İkinci donörün 24 ve 48 saatlik etil paraben maruziyetinde uygulanan tüm dozların profillerinde 1350 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu görülmüştür.

PM7 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 550, 850 ve 1000 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde etil parabenin 10 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 1350 ve 1550 bç büyüklüğünde iki yeni bant oluştuğu; 25 µg/ml'lik dozunda 700, 1350 ve 1550 bç büyüklüğünde üç yeni bant oluşurken 550 ç'lik bantın kaybolduğu; 50 µg/ml'lik dozunda 1350 ve 1550 bç'lik iki yeni bant oluşurken 550 bç'lik bantın kaybolduğu; 100 µg/ml'lik dozunda ise 1000 ve 550 bç'lik bantların kaybolup 1350 ve 1550 bç'lik iki yeni bant oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik maruziyetlerde 10 ve 25 µg/ml'lik dozlarda 1350 bç lik birer yeni bant oluşurken; 50 µg/ml'lik dozda 550 bç'lik bantın kaybolduğu; 100 µg/ml'lik dozunda ise 1350 bç büyüklüğünde bir yeni bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 50 µg/ml metil paraben maruziyeti sonunda RAPD profilinde 1000 ve 550 bç'lik bantların kaybolduğu; 25 µg/ml'lik dozda 1350 bç'lik bir; 50 ve 100 µg/ml'lil etil paraben dozlarında ise 1550, 1350 ve 700 bç'lik üç yeni bantın oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik tüm metil paraben uygulamalarda ise 10

ve 100 µg/ml'lik dozlarda 1350 bç'lik bir; 25 ve 50 µg/ml 'lik dozlarda ise 1350 ve 700 bç'lik iki yeni bant oluştuğu görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1600 ve 450 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyette metil parabenin 10 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 1200 ve 600 bç büyüklüğünde iki; 25 µg/ml'lik dozunda 1200 ve 550 bç büyüklüğünde iki; 50 µg/ml'lik dozunda 1000b bç'lik bir ve 100 µg/ml'lik dozunda ise 1000 ve 600 bç'lik iki yeni bant oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik etil paraben maruziyetinde yalnız 100 µg/ml dozunda 1200 ve 600 bç'lik iki yeni bant oluştuğu görülmüştür. 100 µg/ml'lik dozlarında ise 600 bç büyüklüğünde birer yeni bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörde ise etil paraben maruziyetinin herhangi bir polimorfizm oluşturmadığı görülmüştür.

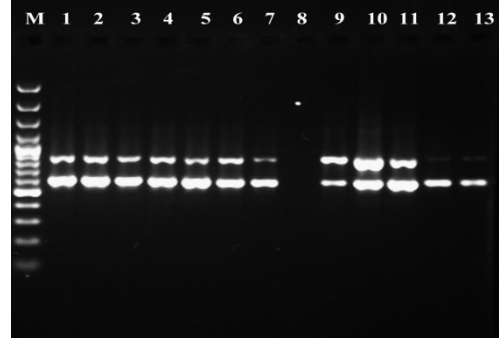
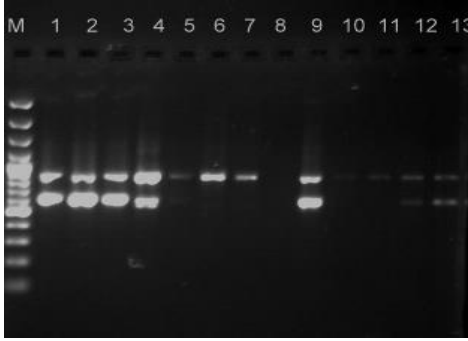
3.2.4. Propil paraben uygulanan örneklerin pm 6, pm 7 ve opa 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları

Propil parabenin 10- 100 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant porfilleri şekil 3.4.'de polimorfik bant sayıları ise tablo 3.7.' de gösterilmiştir.

PM 6 PRİMERİ

1. DONÖR

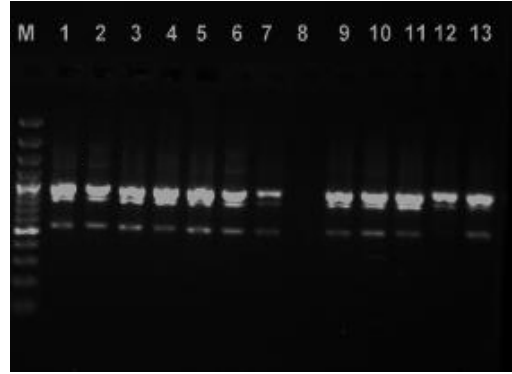
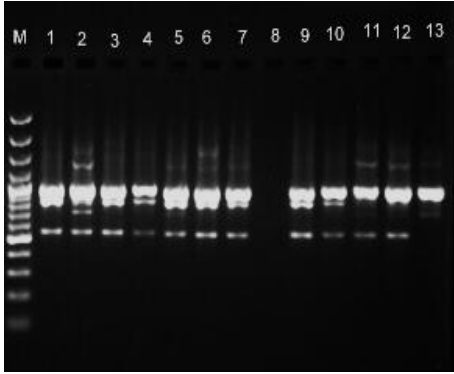
2. DONÖR



PM 7 PRİMERİ

1. DONÖR

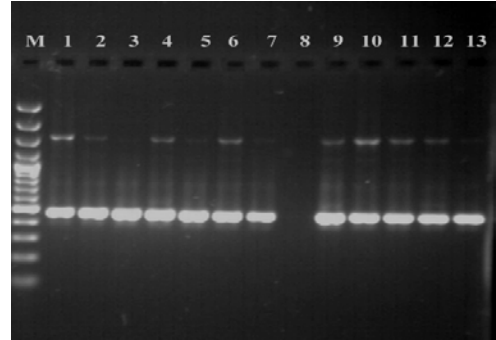
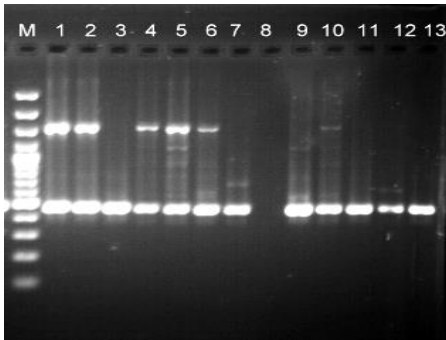
2. DONÖR



OPA 2 PRİMERİ

1. DONÖR

2. DONÖR



M: Marker (yukarıdan aşağıya doğru 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bp); **1:** Spontan, **2:** DMSO, **3:** EMS 0,1 µl/ml **4:** Propil p.10 µg/ml , **5:** Propil p 25 µg/ml, **6:** Propil p 50 µg/ml, **7:** Propil p 100 µg/ml, **8:** DNA yok (negatif kontrol), **9:** EMS 0,1 µl/ml , **10:** Propil p 10 µg/ml , **11:** Propil p 25 µg/ml, **12:** Propil p 50 µg/ml, **13:** Propil p 100 µg/ml

Şekil 3.4. 24 ve 48 saatlik propil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri

Tablo 3.7. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve propil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1.Donör RAPD profili	PM6	2	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0
	PM7	3	0	0	2	2	1	0	0	2	2	3
	OPA2	2	1	0	1	0	2	3	0	1	2	1
2.Donör RAPD profili	PM6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PM7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	OPA2	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde propil parabenin 10, 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarında yaklaşık 600 bç büyüklüğündeki bantın kaybolduğu görülmüştür. 48 saatlik propil paraben uygulamasında 10 ve 25 µg/ml'lik dozlarında 600 bç'lik bantın kaybolduğu ve 900 bç'lik bantların da yoğunluğunda azalma görülmüştür. İkinci donörün 48 saatlik propil paraben maruziyetinde 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarda 900 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma görülmüştür.

PM7 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 550, 850 ve 1000 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde propil parabenin 25 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 1350 ve 750 bç büyüklüğünde iki yeni bant; 50µg/ml'lik dozunda 1350 ve 1550 bç büyüklüğünde iki yeni bant; 100 µg/ml'lik dozunda 1350 bç'lik yeni bir bant oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik maruziyetlerde 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarda 1350 bç lik birer yeni bant oluşurken 850 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür. 100 µg/ml'lik dozda 550 ve 850 bç'lik bantların kaybolduğu 750 bç'lik yeni bir bantın oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 48 saatlik 50 µg/ml propil paraben maruziyeti sonunda RAPD profilinde 550 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1600 ve 450 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyette propil parabenin 25 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 1200 bç

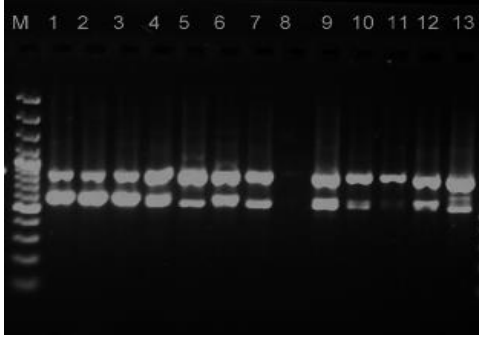
büyükliğünde yeni bir bant oluştuğu; 100 µg/ml’lik dozunda 700 bç büyükliğünde yeni bir bant oluşurken 1600 bç’lik bantın kaybolduğu görülmüştür. 48 saatlik propil paraben maruziyetinde 25, 50 ve 100 µg/ml’lik dozlarda 1600 bç’lik bantın kaybolduğu bunu yanında 50 µg/ml’lik dozda yarıca 700 bç’lik yeni bir bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörde ise propil parabeninin 24 ve 48 saatlik 100 µg/ml’lik dozunda 1600 bç’lik bantın kaybolduğu görülmüştür.

3.2.5. İso-propil paraben uygulanan örneklerin pm 6, pm 7 ve opa 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları

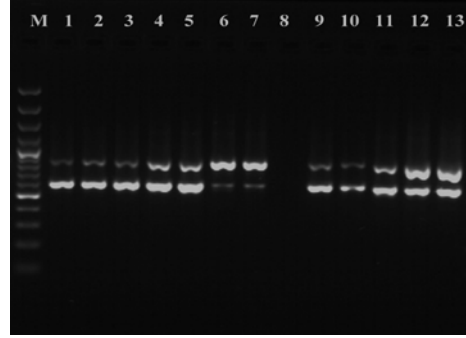
İso-propil parabenin 10- 100 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant profilleri şekil 3.5.’ de polimorfik bant sayıları ise tablo 3.8.’ de gösterilmiştir.

PM 6 PRİMERİ

1. DONÖR

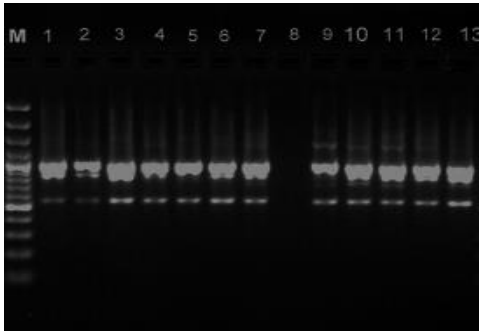


2. DONÖR

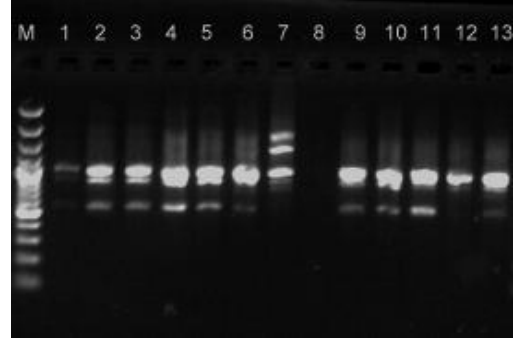


PM 7 PRİMERİ

1. DONÖR

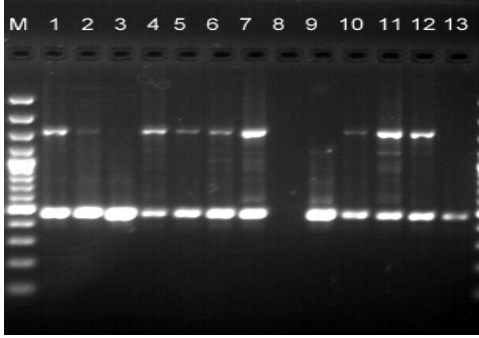


2. DONÖR

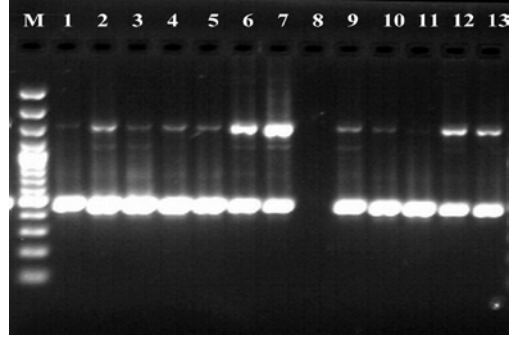


OPA 2 PRİMERİ

1. DONÖR



2. DONÖR



M: Marker (yukarıdan aşağıya doğru 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bp); **1:** Spontan, **2:** DMSO, **3:** EMS 0,1 µl/ml **4:** İsoptopil p 10 µg/ml, **5:** İsoptopil p 25 µg/ml, **6:** İsoptopil p 50 µg/ml, **7:** İsoptopil p 100 µg/ml, **8:** DNA yok (negatif kontrol), **9:** EMS 0,1 µl/ml , **10:** İsoptopil p 10 µg/ml , **11:** İsoptopil p 25 µg/ml, **12:** İsoptopil p 50 µg/ml, **13:** İsoptopil p 100 µg/ml

Şekil 3.5. 24 ve 48 saatlik isopropil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri

Tablo 3.8. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve isopropil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1.Donör RAPD profili	PM6	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1
	PM7	3	0	0	1	0	1	0	2	2	0	1
	OPA2	2	1	0	0	0	2	1	0	1	0	1
2.Donör RAPD profili	PM6	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	PM7	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	OPA2	2	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde isopropil parabenin 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarında sırasıyla yaklaşık 1000 ve 1100 bç büyüklüğünde iki bantın oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik isopropil paraben uygulamasında 25 µg/ml'lik dozda 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma olduğu 100 µg/ml'lik dozda 700 bç'lik yeni bir bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik isopropil paraben maruziyetinde 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarda 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma görülmüştür.

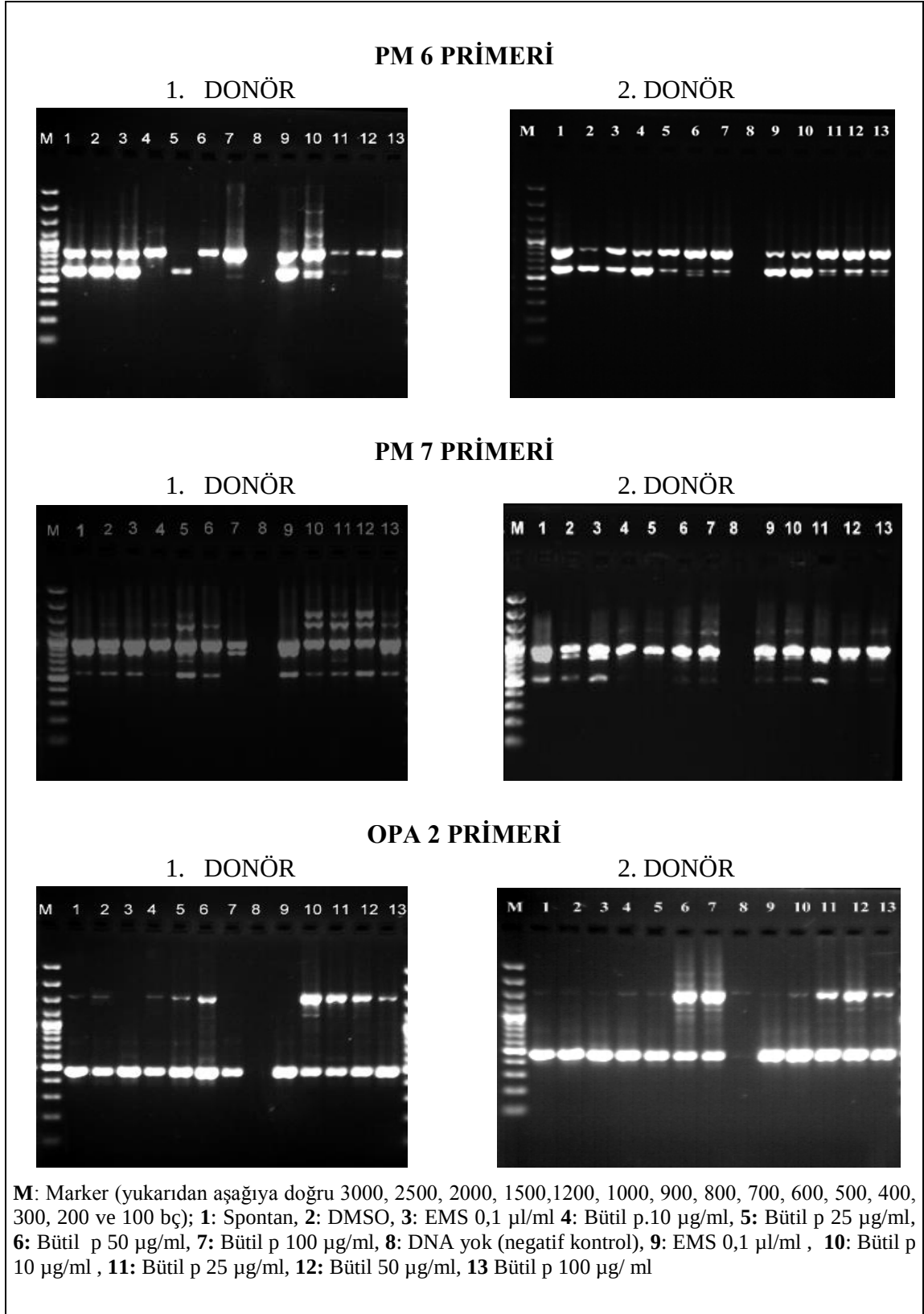
PM7 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 550, 850 ve 1000 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde isopropil parabenin 25 µg/ml'lik dozunda 850 bç'lik bantın kaybolduğu; 100 µg/ml'lik dozunda 700 bç'lik yeni bir bant oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik maruziyetlerde 10 ve 25 µg/ml'lik dozlarda 1350 bç ve 700 bç'lik ikişer yeni bant; 100 µg/ml'lik dozda 750 bç'lik yeni bir bantın oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 100 µg/ml isopropil paraben maruziyeti sonunda RAPD profilinde 550 bç'lik bantın kaybolduğu; yaklaşık 1450 ve 1700 bç'lik iki yeni bant oluştuğu; 48 saatlik 50 µg/ml isopropil paraben maruziyeti sonunda ise 550 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1600 ve 450 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24

saatlik maruziyette isopropil parabenin 100 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 550 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu; 48 saatlik maruziyet sonrası ise 25 µg/ml'lik dozda 1350 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu; 100 µg/ml'lik dozda ise 1600 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür. İkinci donörde ise propil parabeninin 24 saatlik 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarında 1350 bç'lik yeni bir bantın oluştuğu görülmüştür.

3.2.6. Bütil paraben uygulanan örneklerin pm 6, pm 7, ve opa 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları

Bütil parabenin 10- 100 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant profilleri şekil 3.6.'da polimorfik bant sayıları ise tablo 3.9.'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. 24 ve 48 saatlik bütil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri

Tablo 3.9. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve bütıl paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1. Donör RAPD profil	PM6	2	0	1	1	1	0	0	2	0	1	0
	PM7	3	0	2	2	1	1	0	3	4	3	2
	OPA2	2	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
2. Donör RAPD profil	PM6	2	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1
	PM7	3	0	2	2	1	1	1	1	0	1	1
	OPA2	2	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde bütıl parabenin 10 ve 50 µg/ml'lik dozunda 600 bç'lik bantın kaybolduğu; 25 µg/ml'lik dozunda ise 900 bç'lik bantın kaybolduğu; 100 µg/ml'lik dozunda 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma görülmüştür. 48 saatlik bütıl paraben uygulamasında 10 µg/ml'lik dozda 1200 ve 1600 bç'lik iki yeni bantın oluştuğu; 25 ve 100 µg/ml'lik dozunda 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma olduğu; 50 µg/ml'lik dozda 600 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik bütıl paraben maruziyetinde 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarda ayrıca 48 saatlik 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarında da 550 bç'lik yeni birer bant oluştuğu görülmüştür.

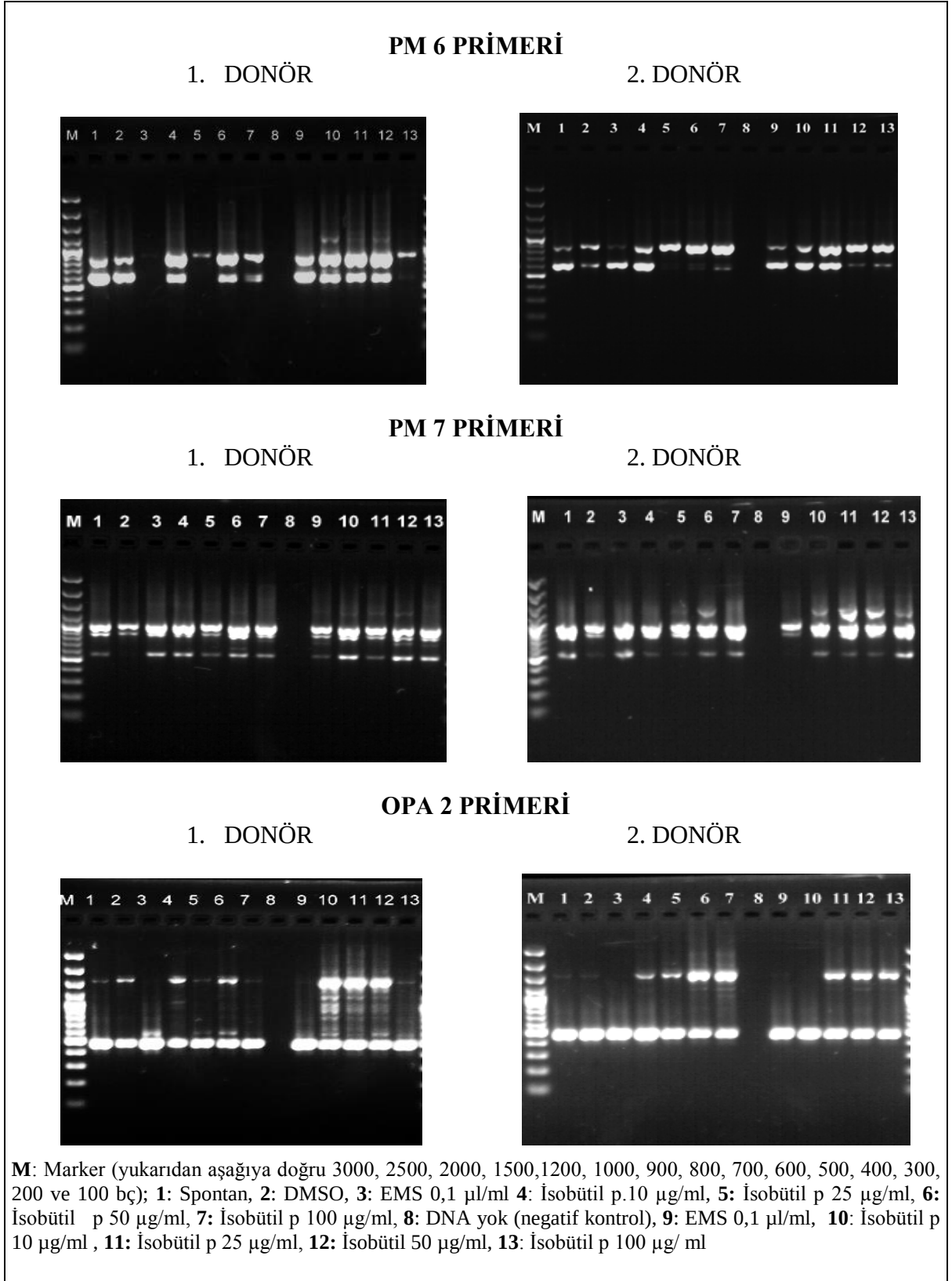
PM7 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 550, 850 ve 1000 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde bütıl parabenin 10 µg/ml'lik dozunda 1350 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluşurken 900 bç'lik bantın kaybolduğu; 25 µg/ml'lik dozunda 700 ve 1450 bç'lik iki yeni bant oluştuğu görülmüştür. 50 µg/ml'lik doz 1450 bç'lik yeni bir bant oluştuğu; 100 µg/ml'lik dozda 550 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür. 48 saatlik maruziyetlerde 10, 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarda 1450 bç ve 1650 bç'lik ikişer yeni bant oluşurken 900 bç'lik bir bantın kaybolduğu ayrıca 25 µg/ml'lik dozda ekstra 700 bç'lik bir bantın daha oluştuğu görülmüştür. 100 µg/ml'lik dozda 1450 ve 1650 bç'lik iki yeni bantın oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 10, 25, 50 ve 100 µg/ml bütıl paraben maruziyeti sonunda RAPD profilinde yaklaşık 1350

bç'lik yeni birer bant oluştuğu; ayrıca 10 ve 25 µg/ml dozlarında 550 bç'lik bantın kaybolduğu; 48 saatlik 10 ve 100 µg/ml dozlarında 1350 bç'lik yeni birer bant oluşurken 50 µg/ml bütül paraben maruziyeti sonunda ise 550 bç'lik bantın kaybolduğu görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1600 ve 450 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyette bütül parabenin 100 µg/ml'lik dozunda 1600 bç'lik bantın kaybolduğu; 48 saatlik 10 µg/ml maruziyeti sonrası ise 1350 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörde ise bütül parabenin 24 saatlik 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarında ayrıca 48 saatlik 50 µg/ml'lik dozunda 1350 bç'lik yeni bir bantın oluştuğu görülmüştür.

3.2.7. İzobütül paraben uygulanan örneklerin pm 6, pm 7, ve opa 2 primerleri ile gerçekleştirilen RAPD-PCR sonuçları

İzobütül parabenin 10- 100 µl/ml dozları ile 24 ve 48 saat muamele edilen örneklerle kontrol örneklerinin bant porfilleri şekil 3.7' de polimorfik bant sayıları ise tablo 3.10.' da gösterilmiştir.



Şekil 3.7. 24 ve 48 saatlik İsobütil paraben maruziyeti sonucu PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profilleri

Tablo 3.10. İki donörün PM6, PM7 ve OPA2 primerleri ile elde edilen RAPD profillerinde kontroldeki bant sayıları ve isobütil paraben muameleli grupların kontrolle kıyaslanması sonucunda elde edilen polimorfik bant sayıları

			24 Saatlik Muamele					48 Saatlik Muamele				
	Primer	KBS*	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml	EMS 0,1 µl/ml	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
1.Donör RAPD profili	PM6	2	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
	PM7	3	0	0	0	1	1	1	1	1	2	1
	OPA2	2	2	1	1	1	0	0	4	1	2	1
2.Donör RAPD profili	PM6	2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
	PM7	3	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
	OPA2	2	1	0	0	1	2	0	0	0	1	0

*KBS: Kontroldeki bant sayısı

PM6 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 600 ve 900 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde isobütil parabenin 25 µg/ml'lik dozunda 600 bç'lik bantın kaybolduğu; 48 saatlik 10 µg/ml isobütil paraben uygulamasında 1350 bç'lik yeni bir bantın oluştuğu; 100 µg/ml'lik dozda ise 600 bç'lik bantın yoğunluğunda azalma olduğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 25 µg/ml isobütil paraben maruziyetinde 600 bç'lik bant kaybolduğu; 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarında ise 550 bç'lik yeni birer bant oluşurken 600 bç'lik bant yoğunluğunun azaldığı görülmüştür.

PM7 primeri ile yapılan PCR sonucunda iki donörde de yaklaşık 550, 850 ve 1000 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik maruziyet değerlendirildiğinde isobütil parabenin 50 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 650 bç büyüklüğünde; 100 µg/ml'lik dozunda yaklaşık 750 bç'lik yeni birer bant oluştuğu görülmüştür. 48 saatlik maruziyetlerde 10, 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarda 1350 bç'lik yeni birer bant oluştuğu; 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarda 800 bç'lik yeni birer bantın oluştuğu görülmüştür. İkinci donörün 24 saatlik 50 µg/ml ve 48 saatlik 10, 25, 50 ve 100 µg/ml'lik dozlardaki isobütil paraben maruziyeti sonunda RAPD profilinde yaklaşık 1350 bç'lik yeni bir bant oluştuğu; görülmüştür.

OPA2 primeri ile yapılan PCR'lar sonucunda iki donörde de yaklaşık 1600 ve 450 bç'lik bantlar elde edilmiştir. İlk donörün lenfosit kültürünün RAPD profilinde 24 saatlik 10 µg/ml'lik isobütil paraben maruziyeti sonrasında yaklaşık 1000 bç büyüklüğünde; 25 ve 50 µg/ml'lik dozlarda ise 550 bç büyüklüğünde yeni birer bant

oluştugu görülmüştür. 48 saatlik 10 µg/ml isobütil paraben maruziyeti sonrası ise 550, 700, 900 ve 1000 bç büyüklüğünde dört yeni; 25 µg/ml'lik dozda 1000 bç'lik yeni bir; 50 µg/ml'lik dozda 550 ve 1000 bç'lik iki yeni; 100 µg/ml'lik dozda ise 550 bç büyüklüğünde yeni bir bant oluştuğu görülmüştür. İkinci donörde ise bütil parabenin 24 saatlik 50 ve 100 µg/ml'lik dozlarında ayrıca 48 saatlik 50 µg/ml'lik dozunda 1200 bç'lik yeni birer bantın oluştuğu; 24 saatlik 100 µg/ml'lik dozunda ayrıca 1000 bç büyüklükte bir bantın daha oluştuğu görülmüştür.

4. TARTIŞMA SONUÇ

Yaşamın her alanında artan kimyasal yükün ekolojik dengeye olumsuz etkileri olduğu ve kimyasalların bazı kronik hastalıkların oluşumunda etkili olduğu bilimsel olarak kanıtlanmıştır (Güler, 1994; Carson 2004; Backhaus vd., 2012). Direk veya indirek yollarla; isteyerek veya istemeyerek kimyasal kullanımının / maruziyetinin kaçınılmaz olduğu günümüz koşullarında, kimyasal maddelerin güvenli üretim ve tüketim süreçlerinin oluşturulabilmesi gerekmektedir. Bu da kimyasalların insan ve çevre sağlığı üzerine zararlı etkilerinin bilimsel araştırmalarla ortaya koyulmasına bağlıdır. Klinik toksikoloji, ekotoksikoloji, genetik toksikoloji gibi alt dalları olan toksikoloji bilimi yeni teknolojik olanaklarla önemli gelişmeler kaydetmiştir. Toksikoloji bu kimyasalların hangi doz ve koşullarda hangi etkileri oluşturduklarını ve etki mekanizmalarını araştırmakla kalmaz, risk yönetim sistemlerinin geliştirilmesine de olanak sağlamaktadır. Bilimin ışığında elde edilen verilerle güvenli olduğu kabul edilen pek çok ürünün piyasadan toplatılması veya henüz üretim aşamasındaki ürünlerin tespit edilen zararları sebebi ile piyasa hiç sunulmamasına olanak sağlar. Aynı zamanda risk yönetim sisteminin aşamalarından olan verilerin ilgili kurumlara ve halka arzı ile ticari veya siyasi saptırmaların yol açtığı kafa karışıklığına sebep olan bilgi kirliliğinin de önüne geçilecektir.

Günlük yaşantımızda çevresel maruziyetin dışında kullanmayı tercih ettiğimiz hazır gıdalarla; bakım, temizlik ve kozmetik ürünleriyle ve ilaçlarla birlikte mecburen tükettiğimiz katkı maddeleri de en çok tartışılan maddelerdendir.

Bu çalışmada antimikrobiyal koruyucular olarak pek çok üründe sıklıkla kombinasyon halinde kullanılan paraben ve esterleri etil; metil; propil, bütül ve isoformları isopropil ve isobütül parabenin genotoksisite potansiyellerini belirlemek amacıyla *in vitro* comet ve RAPD-PCR testleri yapılmıştır.

Parabenler yüksek antimikrobiyal etkinlikleri ve hızlı metabolize edilerek çok düşük toksik risk taşımaları sebebi ile güvenli kabul edilen katkı maddelerinden olmakla birlikte düşük seviyede de olsa östojenik etki gösterdikleri bilinmektedir. Özellikle Darbre ve arkadaşlarının (2004) meme tümöründe metabolize edilmemiş halde tespit ettikleri paraben türevleri ile kanser ve xenoöstojenler tartışmalarında paraben de yerini almıştır.

Bundan sonraki çalışmalarda da sağlıklı dokulara kıyasla kanserli dokularda daha yüksek oranda metabolize edilmemiş paraben türevi tespit edilmiştir (Shanmugam vd.,

2010; Barr vd., 2012; Sajid vd., 2015; Doğan, 2016). Sadece bu veriyle kanser ve parabenler arasında direk ilişki kurmak çok sağlıklı olmamakla birlikte; alkil zincir uzadıkça artan lipofilik özellikleriyle birikme eğilimi ve östorejenik aktivitesi artan türevlerin genetik stabiliteye de etkili olabileğini ve tüm bu etkilerin birlikte değerlendirilmesi gereği vurgulanarak östorejenik etki mekanizmasının ve genotoksik etkilerin de ayrıntılı olarak çalışılması önerilmektedir (Darbre ve Harvey, 2008).

Parabenlerin östojenik etkinliği doğal östrojene göre oldukça düşük olmakla (Van Meeuwen vd., 2008) birlikte yapılan bazı çalışmalarda endokrin bozucu etkiler gösterdiği de tespit edilmiştir (Wei 2009; Oishi 2002).

Bu bulgu bu kimyasalların kanser oluşum sürecinde direk etkili olduklarını göstermemekle birlikte, özellikle kozmetik sektöründe yaygın olarak kullanılan bu kimyasalların vücutta birikebileceğini dolayısıyla güvenlik açısından yeniden değerlendirilmesi gereğini ortaya koymuştur.

Parabenlerle özellikle piyasada sık kullanılan esterleriyle yapılan genotoksisite çalışmalarına farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Örneğin AMES testleriyle yapılan çalışmalardan metil propil paraben maruziyetinin farklı suşlarla yapılan deneylerde *S. typhimurium*'un TA100 suşu hariç mutajenik etki göstermediği (Soni vd.,2002); TA98 ve TA100 suşları ile yapılan başka bir çalışmada ise parabenin artan konsantrasyonu ile mutajenik etkisinin arttığı tespit edilmiştir (Aydoğan, 2016).

In vivo olarak yapılan bir çalışmada günlük 5000 mg/kg'a ulaşan dozlarda paraben uygulamalarında dahi ratların kemik iliği hücrelerinde kromozom aberasyonu oluşmadığı bildirilmiştir CHO hücrelerinde metil-, etil-, propil- ve bütül paraben türevlerinin bizim bulgularımızla örtüşen şekilde alkil zincir uzadıkça poliploid hücre oluşum frekansını artırdığı ve kontrol grubunda göre kromozom aberasyonunu önemli oranda artırdığı görülmüştür (Soni vd., 2002).

CHO –K1 hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da propil ve bütül paraben maruziyetinin etkileri comet; SCE ve CA testleri ile değerlendirildiğinde doza bağlı DNA hasarı oluştuğu ve SCE ve CA frekansının arttığı tespit edilmiştir (Tayama 2008).

Vero hücre hattında 24 saatlik propil paraben maruziyetinin hücre canlılığından çok hücre proliferasyonunu etkilediği; mitotoik hücre yüzdesinde doza bağlı olarak azalma olduğu; oksidatif hasar şeklinde belirlenen genotoksik etkilerin yanında bu tez çalışmasında kullanılan alkali comet yöntemi ile yapılan uygulamada da çalışmamızın bulgularıyla örtüşen DNA'da çift iplik kırıkları olduğu rapor edilmiştir (Martin 2010).

Yapılan çalışmalarda metabolize edilmemiş paraben türevlerine serum ve seminal sıvıda tespit edilmiştir (Frederiksen vd., 2011). Buna paralel bir çalışmada sadece üriner paraben varlığı değil etkileri de araştırılmıştır. Tespit edilen bütıl seviyesiyle birlikte comet yöntemi ile tayin edilen sperm DNA hasarının da arttığı tespit edilmiştir (Meeker vd., 2011).

Genotoksisite tespitine yönelik çalışmalarda en az iki test sisteminin değerlendirmeye alınması tavsiye edilmektedir. Bu çalışmada da paraben ve esterlerinin genotoksik potansiyelini belirlemek için izole edilen lenfositlerde 1 saatlik madde maruziyeti sonucunda Comet testi ve kültüre edilen lenfositlerde ise 24 ve 48 saatlik madde maruziyeti sonunda RAPD testi uygulanmıştır. Comet testi primer DNA hasarında zincir kırıklarının tespitinde kullanıldığı için maruziyet süresinin de kısa tutulması tavsiye edilmektedir (Brendler-Schwaab vd., 2005). Değişen maruziyet süresi hesaba katılarak ve litartürde comet ve diğer sitogenetik yöntemlerle birlikte RAPD yönteminin de kullanıldığı yayınlarda (Jin vd., 2009) olduğu gibi comet testinde RAPD-PCR'da uygulanan dozlardan daha yüksek dozlar uygulanmıştır. Comet testinin uygulanmasından önce deneyde sitotoksisiteden kaynaklı DNA hasarının sonucu etkilememesi için Tripan mavisi testi ile canlılık testi yapılmıştır. Comet testinde test maddelerinin de farklı dozlarda uygulandığı görülmektedir. Zira yapılan tripan mavisi testiyle 1000 µg/ml olarak belirlenen başlangıç dozu (litaratür taramasıyla belirlenen doz aralığında %80 canlılığın olduğu en yüksek doz) sadece paraben için kullanılabilmiş, litartürle uyumlu olarak alkil zincir uzadıkça sitotoksisitenin arttığı dolayısıyla %80 canlılığın sürdüğü başlangıç dozunun paraben türevlerinde düştüğü görülmektedir. Paraben için doz aralığı 1000- 250 µg/ml iken; metil paraben için 750- 125 µg/ml; etil paraben için 500- 50 µg/ml; propil ve isopropil paraben için 250- 25 µg/ml; bütıl ve isobütıl içinse 125- 10 µg/ml olarak belirlenmiştir. Comet testinde genotoksisite belirteci olarak, kullanılan yazım programındaki parametrelerden yaygın kullanılan comet kuyruk uzunluğu seçilmiş ve gene litarürle uyumlu olarak sitotoksisite potansiyelinde olduğu gibi alkil zincir uzadıkça genotoksik hasar oluşturma potansiyelinin arttığı; bütıl ve izoformu isobütılın en yüksek genotoksisite potansiyeli gösterdiği tespit edilmiştir. Comet testi ile elde edilen sonuçlara göre paraben ve esterlerinin doza bağlı kuyruk uzunluğunu artırdığı tespit edilmiştir.

RAPD-PCR yöntemi rastgele primerler kullanılması, yüksek hassasiyeti gibi avantajları yanında tekrar edilebilir sonuçların elde edebilmek için tüm PCR

koşullarının iyi optimizasyonun şart olduğu yöntemdir. RAPD-PCR yapılacak primerler rastgele seçilir ancak genotoksisiteyi tespitiye yönelik RAPD uygulamalarında çalışmaya devam edebilmek için polimorfik, tekrar elde edilebilir PCR ürünleri elde etmek gerekmektedir (Atienzar vd., 2001). RAPD-PCR yöntemi kalitatif bir yöntem olarak kabul edilerek daha spesifik yöntemlerle desteklenmesi tavsiye edilmiş olmakla birlikte, test maddelerinin genomik kararlık üzerindeki etkilerini, maddelerin etkisiyle yeni oluşan veya kaybolan bantları ifade etmek için genomik kalıp stabilitesi yüzdeleri hesaplanmaktadır. Ancak sağlıklı bir genomik stabilite hesabı yapabilmek için kullanılan primerle uygun sayılarda bant elde edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada kullanılan primerlerle kontrol gruplarında az sayıda bant elde edilmiştir. Ayrıca ilk aşamada uygulanan 10 primer setinden yalnızca 3 tanesi ile RAPD-PCR için kullanılabilir polimorfik bantlar elde edildiğinden değerlendirilen primer sayısı da genomik stabilite yüzde hesabı yapılması için yeterli görülmemiştir. Ancak literatürde madde uygulaması sonucu genotoksisite göstergesi olarak sadece kontrol gruplarına göre uygulama gruplarında oluşan polimorfik RAPD profillerinin sunulduğu çalışmalar da bulunmaktadır (Noel ve Rath, 2006). Bu çalışmada da RAPD profillerinde test grupları kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak oluşan yeni bantlar ve kaybolan bantlar için 1 değeri verilerek skorlama yapılmıştır. RAPD PCR neticesinde tüm paraben uygulamalarında kontrol profillerine göre polimorfik bantlar gözlemlenmiştir. Kaybolan bantlar, oluşan yeni bantlar veya bant yoğunluklarının değişimi primer bağlanma bölgelerinde madde maruziyetine bağlı bir hasar oluştuğu göstermektedir (Castaño ve Becerril, 2004). Bu çalışmaya göre paraben ve türevlerinin bir genetik hasar göstergesi olarak genomik stabiliteyi etkilediği söylenebilir. Ancak RAPD-PCR yönteminde daha fazla bant oluşturan primerlerin belirlenerek daha fazla bölgeyi de tarayabilmek için primer sayısını artırarak daha ayrıntılı çalışmaların yapılması ve RAPD yönteminin hassasiyetinin ve etkinliğinin artırılması gerekmektedir.

Bu çalışmaya paralel insan lenfosit kültüründe sitogenetik yöntemlerle genetik hasarın tespitine yönelik iki çalışmadan ilkinde insan lenfositlerinin kültürüne etil, metil, popil ve bütil parabenin 125-1000 µg/mL dozları uygulanmıştır. Deneylerde parabenlerin Kardeş kromotid değişimi ve MN sıklığını istatistiki olarak önemsiz bir oranda artırdığı ayrıca *in vivo* çalışmalarda *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) yapılmış kullanılan hiçbir paraben dozunun genetik hasar yol açmadığı tespit edilmiştir (Ayar, 2013).

Diğer çalışmada ise insan lenfosit kültüründe parabenin 500- 50 µg/ml ve türevlerinin (etil-, metil- propil-, isopropil-, bütül- ve isobütül paraben) 100- 10 µg/ml'lik dozların kullanılmış, bizim çalışmamızla uyumlu doza ve alkil zincir uzunluğuna bağlı olarak MN; CA ve SCE frekanslarında artış tespit edilmiştir (Bayülken, 2015).

Yapılan çalışmalarda paraben maruziyeti sonrasında serbest paraben seviyelerinin idrarda yüksek kanda ise düşük olduğunu görülmektedir (Smith vd., 2012). Bu da paraben türevlerine maruziyetin yüksek olduğunu ancak iyi metabolize edildiklerinin bir kanıtıdır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle kanser dokularında metabolize edilmemiş paraben esterlerinin tespiti, günlük yaşamda kullandığımız pek çok üründe bulunan bu maddelere küçük dozlarda da olsa kronik bir maruziyetin varlığı alkil zinciri uzadıkça lipofilik karakteri artıran bu maddelerin yağ dokularında birikiminin mümkün olduğunun bir göstergesidir. Bu maddelerin zayıf östrojenik etkilerinin yanında literatürdeki pek çok çalışmayla uyumlu olarak bizim de elde ettiğimiz sonuçlara göre genotoksik potansiyelleri olduğu da hesaba katılmalıdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda parabenlerin plasentadan geçebildiği (Frederiksen vd., 2008) tespit edildiğinden özellikle hassas grupların içeriğinde bu maddeleri bulunduran ürünleri daha dikkatli kullanması önerilir. Tüm bu veriler ışığında kanaatimizce Danimarka'da 3 yaş altı bebekler için üretilen ürünlerde paraben kullanımının yasaklanması yaygınlaştırılması gereken sınırlamalardan biridir.

KAYNAKÇA

- Alsulaimani, A. A., Awad, N. S., El-Tarras, A. E. (2011). Detection of genomic instability in hypospadias patients by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) method. *African Journal of Biotechnology*, 10 (20), 4029-4032.
- Atienzar, F. A., Cheung, V. V., Jha, A. N., Depledge, M. H. (2001). Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences*, 59 (2), 241-250.
- Atienzar, F. A., Billinghamurst, Z., Depledge, M. H. (2002). 4-n-Nonylphenol and 17- β estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environmental Pollution*, 120 (3), 735-738.
- Atienzar F.A., Venier P., Jha A.N. (2002). Evaluation of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay for the detection of DNA damage and mutations. *Mutation Research*, 521 (1), 151–163.
- Atienzar, F.A. ve Jha, A.N. (2006). The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research*, 613 (2), 76-102.
- Aravinthan S, Parkash Chand, Vishnu Bhat B., Sridhar M G., Ramachandra Rao, (2012). Evaluation of DNA damage in babies with Neural Tube Defects. *Current Neurobiology*, 3 (2): 129-131.
- Arayasiri, M., Mahidol, C., Navasumrit, P., Autrup, H., Ruchirawat, M. (2010). Biomonitoring of benzene and 1, 3-butadiene exposure and early biological effects in traffic policemen. *Science of The Total Environment*, 408 (20), 4855-4862.
- Arutyunyan, R., Rapp, A., Greulich, K. O., Hovhannisyan, G., Haroutiunian, S., Gebhart, E. (2005). Fragility of telomeres after bleomycin and cisplatin combined treatment measured in human leukocytes with the Comet-FISH technique. *Exp Oncol.*, 27 (1), 38-42.

- Ayar A., (2013). *Bazı Parabenlerin Genotoksik Etkilerinin In Vivo ve In vitro Şartlarda Kısa Süreli Test Teknikleri ile Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- Aydoğan M., (2016). *Parabenin Ames Salmonella/mikrozom Testi ile Mutajenik Aktivitesinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Giresun: Giresun Üniversitesi.
- Backhaus T., Snape J., Lazorchak J., (2012) The Impact of Chemical Pollution on Biodiversity and Ecosystem Services: the Need for an Improved Understanding. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 8 (4), 575–576.
- Bando H., Mohri S., Yamashita F., Takakura Y., Hashida M. (1997). Effects of skin metabolism on percutaneous penetration of lipophilic drugs. *J. Pharm. Sci.*, 86, (6), 759–761.
- Barr, L., Metaxas, G., Harbach, C., Savoy L., Darbre, P. (2012) Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *Journal of Applied Toxicology*, 32 (3), 219-32.
- Baumgartner, A., Schmid, T. E., Cemeli, E., Anderson, D. (2004). Parallel evaluation of doxorubicin -induced gene the comet assay and spectral karyotyping. *Mutagenesis*, 19 (4), 313-318.
- Baydar, M., Aydın, S., Ündeğer, Ü. B., Orhan, G., Fikri, A. K., Başaran, N. (2013). Assessment of DNA Damage in the Peripheral Lymphocytes of Patients with Parkinson's Disease and Multiple Sclerosis Using the Comet Assay. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 33 (4), 936-945.
- Bayülken, D., (2015), *Paraben ve Türevlerinin Klastojenik Etkilerinin İnsan Periferik Lenfositlerinde In vitro Sitogenetik Yöntemlerle Araştırılması*, Doktora Tezi, Eskişehir: Anadolu Üniversitesi.
- Becerril, C., Ferrero, M., Sanz, F., Castaño, A. (1999). Detection of mitomycin C-induced genetic damage in fish cells by use of RAPD. *Mutagenesis*, 14 (5), 449-456.

- Becerril, C., Acevedo, H., Ferrero, M., Sanz, F., Castano, A. (2001). DNA fingerprinting comparison of Rainbow Trout and RTG-2 line using random amplified polymorphic DNA. *Ecotoxicology*, 10 (2), 115- 124.
- Blasiak, J., M. Arabski, R. Krupa, K. Wozniak K., Zadrozny M., Kasznicki J., Zubawska M., Drzewoski J. (2004). DNA damage and repair in type 2 diabetes mellitus. *Mutat. Res.*, 554 (1), 297-304.
- Błaszczak, A., Skolimowski, J., Materac, A. (2006). Genotoxic and antioxidant activities of ethoxyquin salts evaluated by the comet assay. *Chemico-biological interactions*, 162 (3), 268-273.
- Brendler-Schwaab, S., Hartmann, A., Pfuhler, S., Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20 (4): 245-254.
- Boberg, J., Taxvig, C., Christiansen, S., Hass U. (2009). Update on uptake, distribution, metabolism and excretion (ADME) and endocrine disrupting activity of parabens. *Report for Danish Environmental Protection Agency*.
- Büyükleyla, M., (2013), *Gıda Katkı Maddesi Sodyum Matabisülfid'in Genotoksik Etkisinin APD-PCR Yöntemi ile Araştırılması*, Doktora tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi.
- Byford, J. R., Shaw, L. E., Drew, M. G. B., Pope, G. S., Sauer M. J., Darbre, P. D. (2002), Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells , *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80 (1), 49-60.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Bishop, A.M., Needham, L.L. (2010). Urinary concentrations of four parabens in the U.S. population: NHANES 2005-2006. *Environ Health Perspect.*, ;118 (5): 679-85.
- Carson, R., (2004), *Sessiz Bahar*, Ç. Güler, Ankara, Palme Yayıncılık
- Cashman, A.L., Warshaw, E.M. (2005). Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*, 16 (2), 57–66.

- Castaño, A. ve Becerril, C. (2004). In vitro assessment of DNA damage after short-and long-term exposure to benzo (a) pyrene using RAPD and the RTG-2 fish cell line. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552 (1), 141-151.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14 (9), 1733-1735.
- Collins, A.R., Dusinská, M., Gedik, C.M., Stětina, R. (1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect*, 104 (3), 465-469.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol*, 6 (3): 249-61.
- Collins, A.R., Osoez, A.A. (2008). Brunborg G, Gaivão I, Giovannelli L, Kruszewski M, et al. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23 (3): 143-51.
- Collins, A. (2014). Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*, 1840 (2), 794–800.
- Çalışır, E.Z. ve Çalışkan, D. (2003). Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 32 (3), 193-206.
- Çulcu, T. (2007). *İnsan Hücrelerindeki DNA Hasar Ve Mutasyonlarının Rapd Tekniği Kullanılarak Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S. (2004). Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*, 24 (1), 5–13.
- Darbre, P.D. ve Harvey, P.W. (2008). Review Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.*, 28 (5), 561–578.

- De Wolf, H., Blust, R., Backeljau, T. (2004). The use of RAPD in ecotoxicology. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 566 (3), 249-262.
- Dieffenbach, C.W., Lowe, T.M., Dveksler, G.S. (1993). General concepts for PCR primer design. *PCR Methods Appl.*, 3 (3), S30-S37.
- Dinçer, Y., Kankaya, S., (2010). DNA Hasarının Belirlenmesinde Comet Assay (2010). *Türkiye Klinkleri J Med Sci*, 30 (4): 1365-73.
- Doğan, S., (2016). *Xenoöstrojenlerin (parabenelerin) Endometiyum Kanserindeki Rolü*. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Antalya: Akdeniz Üniversitesi.
- Duydu, Y., Başaran, N., Üstündağ, A., Aydın, S., Ündeğer, Ü., Ataman, O. Y., Golka, K. (2012). Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. *Archives of toxicology*, 86 (1), 27-35.
- El-Wassef, M., El-Saeed, G.S. M., El-Tokhy, S.E., Raslan H.M., Tawfeek S., Siam I., Salem S.I., (2012). Oxidative DNA Damage In Patients With Type 2 Diabetes Mellitus, *Diabetologia Croatica*, 41 (4), 121-127.
- El-Nahas, A.F., Mohamed, A.A.A., Zweel, H.H., El-Ashwamy, I.M. (2011). Hepatorenal and genotoxic effects of genetically modified quail meat in a 90-day dietary toxicity study in mice. *International Food Research Journal*, 18 (4), 1313-1319.
- Frederiksen, H., Taxvig, C., Hass, U., Vinggaard, A.M., Nellemann C. (2008). Higher levels of ethyl paraben and butyl paraben in rat amniotic fluid than in maternal plasma after subcutaneous administration. *Toxicol Sci.*, 106 (2), 376-383
- Frederiksen, H., Jorgensen, N., Andersson, A.M. (2011) Parabens in urine, serum and seminal plasma from healthy Danish men determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *J Expo Sci Environ Epidemiol.*, 21 (3), 262-71.
- Forchhammer, L., Bräuner, E.V., Folkmann, J.K., Danielsen, P.H., Nielsen, C., Jensen, A. (2008). Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in

- mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis*, 23 (3): 223-231.
- Gedik, C.M., Ewen, S.W., Collins, A.R., (1992). Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol*, 62 (3): 313-320.
- Grover, P., Danadevi, K., Mahboob, M., Rozati, R., Banu, B. S., Rahman, M. F. (2003). Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet assay. *Mutagenesis*, 18 (2), 201-205.
- Gupta, N., Sarin, N. B., (2009). Heavy metal induced DNA changes in aquatic macrophytes: Random amplified polymorphic DNA analysis and identification of sequence characterized amplified region marker. *Journal of Environmental Sciences*, 21 (5), 686–690.
- Guida, M., Guida, M., De Felice, B., Santafede, D., D'Alessandro, R., Di Spiezio Sardo, A., Scognamiglio M, Ferrara C, Bifulco G, Nappi, C. (2010). Assessment of DNA damage by RAPD in *Paracentrotus lividus* embryos exposed to amniotic fluid from residents living close to waste landfill sites. *BioMed Research International*, 7.
- Inai, K., Aoki, Y., Akamizu, H., Eto, R., Nishida, T., Tokuoka, S. (1985). Tumorigenicity study of butyl and isobutyl p-hydroxybenzoates administered orally to mice. *Food and Chemical Toxicology*, 23 (6), 575-578.
- Itoh, T., Mitsumori, K., Kawaguchi, S., Sasaki, Y. F., (2006). Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 603; 2, 135-144.
- Jeppesen, D.K., Bohr, V.A., Stevnsner, T. (2011). DNA repair deficiency in neurodegeneration. *Prog Neurobiol.*, Jul; 94 (2):166-200.
- Jin, X., Chen, Q., Tang, S., Zou, J.J., Chen, K.P., Zhang, T., Xiao, X.L. (2009). Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the

- comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. *Toxicology in Vitro*, 23 (7), 1209–1214.
- Karabiyik, L., Sardas, S., Polat, U., Kocabas, N.A., Karakaya, A.E. (2001). Comparison of genotoxicity of sevoflurane and isoflurane in human lymphocytes studies in vivo using the comet assay. *Mutat. Res.*, 492 (1), 99–107.
- Kamel, F. ve Hoppin J.A., (2004). Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease. *Environ Health Perspect*, 112 (9): 950–958.
- Klug, W.S. ve Cummings, M.R. (2003). *Genetik Kavramlar*, (Çeviri Editörü: Prof.Dr. Cihan Öner). Ankara: Palme Yayıncılık.
- Kramer, P.J. (1998). Genetic Toxicology. *J Pharm Pharmacol*, 50: 395-405.
- Kirchhof, M.G. ve Gannes, G.C. (2013). The Health Controversies of Parabens, *Skin Therapy Letter*: 18(2), 5-7.
- Kumar, N.S. ve Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Sci Vis.*, 11(3), 116-124.
- Labat, L., Kummer, E., Dallet, P., Dubost, J.P., (2000). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the determination of parabens in a cosmetic product. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis* 23, 763–769.
- Lee, Y.C., Yang, V.C., Wang, T.S. (2007). Use of RAPD to detect sodium arsenite-induced DNA damage in human lymphoblastoid cells, Toxicology 239 (2007) 108–115 man breast tumours. *Journal of Applied Toxicology*, 24, 5–13.
- Liu, W., Li, P. J., Qi, X. M., Zhou, Q. X., Zheng, L., Sun, T. H., Yang, Y.S. (2005). DNA changes in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings induced by cadmium pollution using RAPD analysis. *Chemosphere*, 61(2), 158-167.
- Liu, W., Yang, Y. S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. A., Sun, T, (2007). Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers. *Chemosphere*, 67:1155-1163.

- Liu, T., Li, Y., Zhao, X., Zhang, M., Gu, W. (2014). Ethylparaben affects lifespan, fecundity, and the expression levels of ERR, EcR and YPR in *Drosophila melanogaster*. *Journal of insect physiology*, 71, 1-7.
- Macioszek, V.K., Kononowicz, A. K. (2004). The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline Yellow (E 104) and Brilliant Black BN (E 151). *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9(1), 107-122.
- Martin, M., V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A. (1993), The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay). A European Review, *Mutation Research*, 288: 47-63.
- Martin, J.M.P., Peropadre, A., Herrero, O., Freire, P. F., Labrador, V., Hazen, M. J. (2010). Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells. *Mutation Research*, 702, 86–91.
- Meeker, J., Yang, T., Ye, X., Calafat, A.M., Hauser, R. (2010). Urinary Concentrations of Parabens and Serum Hormone Levels, Semen Quality Parameters, and Sperm DNA Damage. *Environ Health Perspect*, 119: 252-257.
- Miller, S., Dykes, D.D., Polesky, H.J. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.*, 16:3, 1215.
- Miteva, R., Georgieva, M., Peycheva, E., Efremov, T., Miloshev, G. (2009). Development of Conditions for Comet Assay Application in Forensic Investigation of Rape and Other Sexual Assaults. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(1), 1093-1094.
- Misra, A., Sulaiman, I. M., Sinha, S., Sarkar, C., Mahapatra, A. K., Hasnain, S. E. (1998). Genetic alterations in brain tumors identified by RAPD analysis. *Gene*, 206(1), 45-48.
- Morita, K., Ishigaki, M., Abe, T. (1981). Mutagenicity of Materials related with Cosmetics, *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan*, 15; 3, 243-253.

- Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E., Lialiaris, T. (2008) Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2390–2393.
- Nas, A, (2011), *Sürekli Ayatktan Periton Diyalizi Yapan Hastalarda DNA Hasarının Comet Test ile Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi.
- Noel, S. ve Rath, S.K. (2006). Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment. *Toxicology and Industrial Health*, 22: 6, 267–275.
- Oishi, S., (2002), Effects of propylparaben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*, 40, 1807-1813.
- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., Kano, I. (2001). ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ERa and PR. *Food and Chemical Toxicology*, 39, 1225–1232.
- Ong, T.M., Song, B., Qian, H.W., Wu, Z.L., Whong, W.Z. (1998). Detection of genomic instability in lung cancer tissues by random amplified polymorphic DNA analysis. *Carcinogenesis*, 19 (1), 233-235.
- Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 123(1):291-8.
- Özkan, D., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H. (2009). Evaluation of the cytogenetic damage induced by the organophosphorous insecticide acephate. *Cytotechnology*, 59(2), 73-80.
- Qari, S.H.M. (2010). DNA-RAPD fingerprinting and cytogenetic screening of genotoxic and antigenotoxic effects of aqueous extracts of *Costus speciosus* (Koen.). *Journal of King Abdulaziz University Science*, 22, 133-152.
- Pandir, D. (2016). DNA damage in human germ cell exposed to the some food additives in vitro. *Cytotechnology*, 68 (4), 725-733.

- Papadopoulos, S., Benter, T., Anastassiou, G., Pape, M., Gerhard, S., Bornfeld, N., Dörken, B. (2002). Assessment of genomic instability in breast cancer and uveal melanoma by random amplified polymorphic DNA analysis. *International Journal of Cancer*, 99 (2), 193-200.
- Pycke, B.F., Geer, L.A., Dalloul, M., Abulafia, O., Halden, R.U. (2015). Maternal and fetal exposure to parabens in a multiethnic urban U.S. population, *Environ Int.* Nov; 84:193-200.
- Rahman, M.F., Mahboob, M., Danadevi, K., Banu, B.S., Grover, P. (2002). Assessment of genotoxic effects of chloropyriphos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 516 (1), 139-147.
- Ribeiro, G.R., Francisco, G., Teixeira, L.V., Romão-Correia, R.F., Sanches, J.A., Neto, C.F., & Ruiz, I.R. (2004). Repetitive DNA alterations in human skin cancers. *Journal of Dermatological Science*, 36 (2), 79-86.
- Roma-Torres, J., Teixeira, J. P., Silva, S., Laffon, B., Cunha, L. M., Méndez, J., Mayan, O. (2006). Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 604 (1), 19-27.
- Saad, A.A., Youssef, M. I., & El-Shennawy, L.K. (2009). Cisplatin induced damage in kidney genomic DNA and nephrotoxicity in male rats: the protective effect of grape seed proanthocyanidin extract. *Food and Chemical Toxicology*, 47(7), 1499-1506.
- Sajid, M., Basheer, C., Narasimhan, K., Choolani, M., Lee, H.K. (2015). Application of microwave- assisted micro-solid-phase extraction for determination of parabens in human ovarian cancer tissues. *Journal of Chromatography B*, 1000:192-198.
- Saleh, N., Ibrahim, M. A., Archoukieh, E., Makkiya, A., Al-Obaidi, M., Alobydi, H. (2010). Identification of genomic markers by RAPD-PCR primer in leukemia patients. *Biotechnology*, 9 (2), 170-175.

- Sardas, S., Karabiyik, L., Aygun, N., Karakaya, A. E., (1998). DNA damage evaluated by the alkaline comet assay in lymphocytes of humans anaesthetized with isoflurane. *Mutat Res*, 418:1-6.
- Sardas, S., Omurtag, G.Z., Monteiro, I.F.C., Beyoglu, D., Tozan-Beceran, A., Topsakal, N., Cotuk, H.B. (2013). Assessment of DNA damage and protective role of vitamin E supplements after exhaustive exercise by comet assay in athletes. *Journal of Clinical Toxicology*, 3 (Special Issue), 5.
- Sasseville, D. (2004). Hypersensitivity to preservatives. *Dermatol Ther*, 17: 251–263.
- Shanmugam, G., Ramaswamy, B. R., Radhakrishnan, V., Tao, H. (2010). GC–MS method for the determination of paraben preservatives in the human breast cancerous tissue. *Microchemical Journal*, 96(2), 391-396.
- Seven B., (2015). *Albino Farelerde Paraben Tarafından Teşvik Edilen Toksisiteye Karşı Isırgan Otu Özütünün Koruyucu Rolünün Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Giresun: Giresun Üniversitesi.
- Singh, K.P. ve Roy, D. (2001). Identification of novel breast tumor-specific mutation (s) in the q11. 2 region of chromosome 17 by RAPD/AP-PCR fingerprinting. *Gene*, 269(1), 33-43.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider E.L., (1988). A simple technique for quantification follow levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184–191.
- Silva, J.P., Gomes, A.C., Proença, F., Coutinho, O.P. (2009). Novel nitrogen compounds enhance protection and repair of oxidative DNA damage in a neuronal cell model: comparison with quercetin. *Chem Biol Interact*, 181(3): 328-37.
- Slyskova, J., Lorenzo, Y., Karlsen, A., Carlsen, M. H., Novosadova, V., Blomhoff, R., (2014). Both genetic and dietary factors underlie individual differences in DNA damage levels and DNA repair capacity. *DNA Repair*, 16, 66–73.

- Smith, K.W., Braun, J.M., Williams. P.L., Ehrlich, S., Correla, K.F., Calafat, A.M. (2012). Predictors and variability of urinary paraben concentrations in men and women, including before and during pregnancy. *Environmental health perspectives*, 120 (11):1538- 1243.
- Spivak, G., Cox, R. A., Hanawalt, P.C. (2009). New applications of the Comet assay: Comet–FISH and transcription-coupled DNA repair. *Mutation Research*, 681 (1), 44–50.
- Soni, M.G., Taylor, S.L., Greenberg, N.A., Burdock, G.A. (2002). Review Evaluation of the health aspects of methyl paraben: a review of the published literature. *Food and Chemical Toxicology*, 40 (10), 1335–1373.
- Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A. (2005). Review Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food and Chemical Toxicology*, 43 (7), 985–1015.
- Şekeroğlu, Z. ve Şekeroğlu, V. (2011). Genetik Toksisite Testleri, *TÜBAV Bilim*, 4(3) 221-229.
- Szulc, M., Zgórska, A., & Ziemińska, A. (2012). PCR-RAPD optimization for hospital wastewater genotoxic influence analysis on *Allium cepa* root meristem cells. *Architecture Civil Engineering Environment*, 5(1), 79-86.
- Tayama, S., Nakagawa, Y., Tayama, K. (2008). Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells. *Mutation Research*, 649 (1), 114-125.
- TenBrook P.L., Tjeerdema R.S., Hann P., Karkoski J. (2008). Methods for Deriving Pesticide Aquatic Life Criteria. D Whitacre (Eds), In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 199 (pp. 1-92). Boston, Springer.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. ve Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221.

- Tozan-Beceran, A., Omurtag, G. Z., Yegen, C., Sardas, S. (2011). Investigation of DNA damage in patients with colorectal cancer and their first degree relatives. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 1(3), 155.
- Uzonur, I., Yuksek, A., Muftuoglu, E., Topcuoglu, S., Ulasli, M., Isik, S., Okus, E. (2007). A Novel Rapd-Pcr Based Dna Damage Assessment Approach For'mussel Watch' DNA. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, 3(4), 5.
- Ündeğer, Ü., Başaran, N., Kars, A., Güç, D. (1999). Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 439 (2), 277-285.
- Van Meeuwen, J.A., Van Son, O., Piersma, A. H., De Jong, P. C., Van Den Berg, M. (2008). Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230 (3), 372-382.
- Von Woedtke, T., Schluter, B., Pflugel, P. (1999). Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances contained. *Pharmazie*, Jun; 54 (6): 452-456.
- Wang, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, W. (2006). Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Anal Chim Acta*. Sep, 577 (1): 62-67.
- Wang, L., Liao, C., Liu, F., Wu, Q., Guo, Y., Moon, H. B., Nakata H., Kannan, K. (2012). Occurrence and human exposure of p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), and their hydrolysis products in indoor dust from the United States and three East Asian countries. *Environ Sci Technol.*, Nov 6; 46 (21):11584-11593.
- Weng, H., Weng, Z., Lu, Y., Nakayama, K., Morimoto, K. (2009). Effects of cigarette smoking, XRCC1 genetic polymorphisms, and age on basal DNA damage in

- human blood mononuclear cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 679(1), 59-64.
- Yazar, K., Johnsson, S., Lind, M.L., Boman, A., Lidén, C. (2011). Preservatives and fragrances in selected consumer-available cosmetics and detergents. *Contact Dermatitis*, May;64.(5): 265-572.
- Yamamoto, H., Tamura, I., Hirata, Y., Kato, J., Kagota, K., Katsuki S., Yamamoto A., Kagami Y., Tatarazako, N. (2011). Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. *Sci Total Environ.* Dec; 410-411:102-11.
- Yen, G.C., Duh, P.D., Su, H.J. (2005). Antioxidant properties of lotus seed and its effect on DNA damage in human lymphocytes. *Food Chemistry*, 89(3), 379-385.
- Yılmaz, S. ve Devran, Z. (2003). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve Bitki Biyoteknolojisinde Yaygın Uygulamaları, *Derim*, 20(1), 31-42.
- Zheng, J., Li, X., Shan, D., Zhang, H., Guan, D. (2012). DNA degradation within mouse brain and dental pulp cells 72 hours postmortem. *Neural Regeneration Research*, 7(4), 290-294.
- Zhiyi, R. ve Haowen, Y. (2004). A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(1), 96-103.
- http://www.cir-safety.org/sites/default/files/paraben_build.pdf; (Eriřim tarihi; 03.05.2016)
- Türkiye Kanseri Kontrol Planı; http://www.iccp-portal.org/sites/default/files/plans/Ulusai_Kanseri_Kontrol_Plani_2013_2018.pdf, (Eriřim tarihi; 03.05.2016)
- <https://www.fda.gov/cosmetics/productsingredients/ucm128042.htm>; (Eriřim tarihi; 07.05.2016)

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ETİK KURUL (DANIŞMA KOMİSYONU) KARARI

09 ARALIK 2011 11) KONU BAŞLIK	(PR-11-12-09-11): “Bazı gıda ve kozmetik katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin insan periferik lenfosit hücrelerinde in vitro yöntemlerle araştırılması”
09 ARALIK 2011 GÖRÜŞ: 11	09.12.2011 tarihli görüş dikkate alınmıştır.
09 ARALIK 2011 KARAR: 11	Raportör görüşü temelinde çalışma olumlu olarak nitelendirilmiştir. Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’na görüş için gönderilmiştir.

Prof. Dr. M. A. AKŞİT
Pediatri Uzmanı

Prof. Dr. B. YAŞAR
Genel Cerrahi Uzmanı

Prof. Dr. Ö. ÇOLAK
Biyokimya Uzmanı

Prof. Dr. D. ÖZBABALIK
Nöroloji Uzmanı

Prof. Dr. S. İŞIKSOY
Patoloji Uzmanı

Prof. Dr. F. S. KILIÇ
Farmakoloji Uzmanı

Prof. Dr. Ö.ELÇİOĞLU
Deontoloji Uzmanı

Dr.Ecz. G.YAZ GÜZEY
Eczacı

Aslının Aynıdır
Prof.Dr.M.Arif AKŞİT
Etik Kurul Başkan Yardımcısı