

**PARABEN VE TÜREVLERİNİN KLASTOJENİK ETKİLERİNİN  
İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO*  
SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Devrim GÜZEL BAYÜLKEN

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim-2015

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma  
Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir. Proje**

**No: 1204F066**

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Devrim GÜZEL BAYÜLKEN'in "Paraben ve Türevlerinin Klastojenik Etkilerinin İnsan Periferik Lenfositlerinde *in vitro* Sitogenetik Yöntemlerle Araştırılması" başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Doktora Tezi 09.10.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) : Doç.Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ	.....
Üye : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI	.....
Üye : Prof. Dr. A.Safa ÖZCAN	.....
Üye : Doç. Dr.Mediha CANBEK	.....
Üye : Doç. Dr. Emel SÖZEN	.....

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Doktora Tezi PARABEN VE TÜREVLERİNİN KLASTOJENİK ETKİLERİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİTLERİNDE *IN VITRO* SİTOGENETİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Devrim GÜZEL BAYÜLKEN

Anadolu Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ  
2015, 123 sayfa

Bu tez çalışmasında paraben ve türevlerinin (metil, etil, propil, izopropil, butil, izobütül) genotoksik ve sitotoksik etkileri *in vitro* olarak insan periferal lenfosit hücrelerinde CBMN (sitokinez blok mikronükleus), SCE (kardeş kromatit değişimi) ve CA (kromozom aberasyonu) yöntemleri ile araştırılmıştır. İnsan periferal lenfositleri 24 ve 48 saat boyunca parabenin 500, 250, 100 ve 50 µg/ml ve paraben türevlerinin 100, 50, 25 ve 10 µg/ml'lik dozlarıyla muamele edilmiştir. Test maddelerinin sitotoksik etkileri CBPI (sitokinez blok proliferasyon indeksi), RI (replikasyon indeksi) ve MI (mitotik indeks) değerleri ile belirlenmiştir. Elde edilen veriler istatistiki açıdan değerlendirilmiştir.

CBMN testinden elde edilen verilere göre tüm test maddeleri CBPI değerlerini anlamlı olarak düşürmüştür. Paraben sadece 48 saatlik maruziyette ve en yüksek dozda (500 µg/ml) MN sayısını anlamlı olarak yükseltmiştir. Paraben türevleri doz ve süreye bağlı olarak MN sayısını anlamlı olarak uyarmıştır. Ayrıca test maddeleri doza ve süreye bağlı olarak hücre başına düşen kromozom aberasyon sayısında (CA/hücre) artışa neden olmuştur. Bu artış butil parabenin sadece en yüksek dozunda (100 µg/ml) görülmüştür. Mitotik indeks (MI) değerleri tüm maddeler ve dozlarda 24 ve 48 saatlik sürelerde düşmüştür. SCE testi sonuçlarına göre paraben lenfositlerde hücre başına düşen SCE frekansını uyarmamıştır. Paraben türevleri hücre başına düşen SCE frekansını arttırmıştır. Replikasyon indeks (RI) değerlerine göre paraben ve türevleri lenfosit hücrelerinde doza ve süreye bağlı olarak düşüşe sebep olmuştur. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde test maddelerinin insan lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik, klastojenik ve genotoksik etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Mikronükleus, Kardeş Kromatit Değişimi, Kromozom Aberasyonu, İnsan Lenfositleri

**ABSTRACT**  
**PhD Thesis**  
**INVESTIGATION OF CLASTOGENIC EFFECTS OF PARABEN**  
**AND ITS DIFFERENTIATIONS IN HUMAN PERIPHERAL**  
**LYMPHOCYTES *IN VITRO* CYTOGENETIC METHODS**

**Devrim GÜZEL BAYÜLKEN**

**Anadolu University**  
**Institute of Science and Technology**  
**Department of Biology**  
**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Berrin Ayaz TÜYLÜ**  
**2015, 123 pages**

In this study, paraben and its differentiations (methyl, ethyl, propyl, isopropyl, buthyl, isobuthyl) were investigated with CBMN (cytokinesis-blocked micronucleus), SCE (sister chromatid exchange) and CA (chromosome aberration) techniques on human peripheral lymphocytes *in vitro*. The cells were treated with 500, 250, 100 and 50 µg/ml paraben and 100, 50, 25 and 10 µg/ml paraben differentiations for 24 h and 48 h treatment periods. Cytotoxic effects of test materials were determined with CBPI (cytokinesis-blocked proliferation index), RI (replication index) and MI (mitotic index). The obtained data were analyzed in terms of statistics.

All test materials significantly reduced CBPI values according to the data obtained from CBMN test were shown to significantly reduced. Paraben significantly increased the number of MN only 48 h treatment period and at the highest dose (500 µg/ml). Paraben differentiations induced significantly the number of MN dose and time dependent. Also test materials increased the number of chromosome aberrations per cell (CA/Cell) with dose and time dependent. This increase was observed butyl paraben's only the highest dose (100 µg/ml). Mitotic index (MI) values decreased in all materials and doses of 24 and 48 h. According to the SCE test results paraben didn't stimulate the SCE frequency of per cell in lymphocytes. Paraben differentiations increased the SCE frequency of per cell. According to the replication index (RI) values paraben and differentiations caused dose and time dependent decrease. When all the results evaluated, it is concluded that test substances possess to cytotoxic, clastogenic and genotoxic effects on human lymphocytes.

**Keywords:** Micronucleus, Sister Chromatid Exchange, Chromosomal Aberrations, Human Lymphocytes

## TEŐEKKÖR

Öncelikle, tez alıŐma konumun belirlenmesi ve tez alıŐmam boyunca değerli bilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve beni yönlendiren danışman hocam Doç. Dr. Berrin AYZAZ TÜYLÜ'ye,

Doktora hayatımı güzel anılarla hatırlamamı sağlayan ve varlıklarını hayatım boyunca hissetmeyi umduğum tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Ve özellikle eğitim hayatım boyunca sevgi ve destekleriyle bana güç veren ailem ile eŐime en içten teŐekkürlerimi sunarım.

Devrim GÜZEL BAYÜLKEN

Ekim, 2015

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iii</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	<b>iv</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Parabenler.....	3
1.2. Sitogenetik Yöntemler .....	8
1.2.1. Sitokinez bloklama mikronukleus testi (CBMN) .....	8
1.2.2. Kardeş kromatid değişim testi (SCE) .....	12
1.2.3. Kromozom aberasyon testi (CA) .....	15
1.3. Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları.....	17
1.4. Parabenlerle İlgili Yapılmış Çalışmalar .....	22
<b>2. MATERYAL VE METOD</b>	<b>27</b>
2.1. Materyal .....	27
2.1.1. Test maddeleri .....	27
2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri .....	27
2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı.....	30
2.1.4. Kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar .....	32
2.2. Metod .....	32
2.2.1. CBMN metodu.....	32
2.2.1.1. Lenfosit kültürü .....	32
2.2.1.2. Test maddelerinin uygulanması .....	32
2.2.1.3. Lenfositlerin izolasyonu .....	33
2.2.1.4. Preparatların hazırlanması .....	33
2.2.1.5. Preparatların boyanması .....	34
2.2.1.6. Mikroskopik inceleme .....	34

2.2.1.7. CBPI' nin (sitokinez blok proliferasyon indeksi) saptanması .....	34
2.2.2. SCE ve CA metodu.....	35
2.2.2.1. Lenfosit kültürü .....	35
2.2.2.2. Test maddelerinin uygulanması .....	36
2.2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu .....	36
2.2.2.4. Preparatların hazırlanması .....	37
2.2.2.5. Preparatların boyanması .....	37
2.2.2.6. Mikroskopik inceleme .....	39
2.2.2.7. SCE sayısının saptanması .....	39
2.2.2.8. Replikasyon indeksi (RI) saptanması .....	40
2.2.2.9. Kromozom anormalliklerinin (CA) saptanması .....	44
2.2.2.10. Mitotik indeksin (MI) saptanması .....	45
2.2.2.11. İstatistiksel analiz.....	45
<b>3. BULGULAR</b>	<b>46</b>
3.1. Paraben ve Türevlerinin Mikronukleus Oluşumu ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri.....	46
3.2. Paraben ve Türevlerinin Kromozom Aberasyonu ve Mitotik İndeks Üzerine Etkileri.....	65
3.3. Paraben ve Türevlerinin Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) ve Replikasyon İndeksi (RI) Üzerine Etkileri .....	86
<b>4. TARTIŞMA-SONUÇ</b>	<b>103</b>
<b>KAYNAKLAR</b>	<b>111</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1.	Lenfositlerin 72 saatlik inkübasyon süresinin farklı aşamaları. M1:1. mitoz, M2: 2. Mitoz aşamaları ve BrdU ile kolşisinin ilave edilmesi (Üstündağ 2004) .....	14
1.2.	Hücre bölünmesi esnasında kromatidlerin farklı tonlarda boyanma mekanizması ( Wulf 1989) .....	14
2.1.	Paraben (4-Hydroxybenzoic acid), Kapalı Formülü: $C_7H_6O_3$ , Moleküler ağırlık: 138,12 g/mol .....	27
2.2.	Etil paraben (Ethyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü: $HOC_6H_4CO_2C_2H_5$ , Moleküler ağırlık: 166,17 g/mol.....	28
2.3.	Metil paraben (Methyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü: $HOC_6H_4CO_2CH_3$ , Moleküler ağırlık: 152,15g/mol .....	28
2.4.	Propilparaben (Propyl4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü: $HOC_6H_4CO_2CH_2CH_2CH_3$ , Moleküler ağırlık: 180,20 g/mol ....	29
2.5.	İzopropil paraben (Isopropyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formül: $C_{10}H_{12}O_3$ , Moleküler ağırlık:180,2 g/mol .....	29
2.6.	Bütıl paraben (Butyl4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü: $HOC_6H_4CO_2(CH_2)_3CH_3$ , Moleküler ağırlık: 194,23 g/mol.....	30
2.7.	İzobütıl paraben(Isobutyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formül: $C_{11}H_{14}O_3$ , Moleküler ağırlık: 194,23g/mol.....	30
2.8.	Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990) .....	39
2.9.	BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaşve Speit 1990'den).....	42
2.10.	Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000).....	43
2.11.	İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000) .....	43



2.12. Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000) .....	44
3.1. Parabenin MN sayısı üzerine etkisi.....	48
3.2. Parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi .....	48
3.3. Metil parabenin MN sayısı üzerine etkisi .....	50
3.4. Metil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi.....	50
3.5. Etil parabenin MN sayısı üzerine etkisi .....	52
3.6. Etil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi.....	52
3.7. Propil parabenin MN sayısı üzerine etkisi .....	54
3.8. Propil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi .....	54
3.9. İzopropil parabenin MN sayısı üzerine etkisi .....	56
3.10. İzopropil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi .....	56
3.11. Butil parabenin MN sayısı üzerine etkisi .....	58
3.12. Butil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi .....	58
3.13. İzobutil parabenin MN sayısı üzerine etkisi.....	60
3.14. İzobutil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi .....	60
3.15. Tek çekirdekli, iki çekirdekli, üç çekirdekli ve dört çekirdekli hücreler (400x) .....	63
3.16. İki çekirdekli (binükleat) hücreler (1000x) .....	64
3.17. İki mikronukleuslu binükleat hücre (1000x).....	64
3.18. Mikronükleus içeren ve içermeyen binükleat hücreler (400x).....	65
3.19. Parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	67
3.20. Parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	67
3.21. Metil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	69
3.22. Metil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	69
3.23. Etil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	71
3.24. Etil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	71
3.25. Propil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	73
3.26. Propil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	73

3.27. İzopropil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	75
3.28. İzopropil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	75
3.29. Butil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	77
3.30. Butil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	77
3.31. İzobutil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi .....	79
3.32. İzobutil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi .....	79
3.33. Kromatid kırığı (1000x) .....	81
3.34. Kromatid kırığı (1000x) .....	82
3.35. Kromatid kırığı (1000x) .....	82
3.36. Disentrik kromozom (1000x) .....	83
3.37. Disentrik kromozom (1000x) .....	83
3.38. Sister union (1000x) .....	84
3.39. Kromozom kırığı (1000x) .....	84
3.40. Kromozom kırığı (1000x) .....	85
3.41. Halka (ring) kromozom (1000x) .....	85
3.42. Sister Union (1000x) .....	86
3.43. Parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	88
3.44. Parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	88
3.45. Metil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	90
3.46. Metil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	90
3.47. Etil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	92
3.48. Etil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	92
3.49. Propil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	94
3.50. Propil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	94
3.51. İzopropil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	96
3.52. İzopropil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	96
3.53. Butil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	98
3.54. Butil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	98
3.55. İzobutil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi .....	100

3.56.	İzobutil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi .....	100
3.57.	Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x) .....	101
3.58.	Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x) .....	101
3.59.	Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x) .....	102
3.60.	Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x) .....	102

## ÇİZELGELER DİZİNİ

3.1. Parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	47
3.2. Metil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreler üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	49
3.3. Etil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	51
3.4. Propil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	53
3.5. İzopropil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus frekansları ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	55
3.6. Butil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus frekansları ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	57
3.7. İzobutil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus frekansları ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri .....	59
3.8. Parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	66
3.9. Metil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	68
3.10. Etil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	70

3.11.	Propil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	72
3.12.	İzopropil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	74
3.13.	Butil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	76
3.14.	İzobutil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi .....	78
3.15.	Parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri ..	87
3.16.	Metil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri .....	89
3.17.	Etil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri .....	91
3.18.	Propil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri .....	93
3.19.	İzopropil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri .....	95
3.20.	Butil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri .....	97
3.21.	İzobutil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri .....	99

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ANOVA</b>	: Analysis of Variance (Varyans Analizi)
<b>BrdU</b>	:5- Bromo – 2'- Deoxyuridine
<b>CA</b>	:Kromozom Aberasyon
<b>CBPI</b>	:Sitokinez Blok Proliferasyon İndeksi
<b>DMSO</b>	:Dimetilsülfoksit
<b>HNO<sub>3</sub></b>	:Nitrik Asit
<b>KCl</b>	:Potasyum klorür
<b>MI</b>	:Mitotik İndeks
<b>MMC</b>	:Mitomycin C
<b>MN</b>	:Mikronukleus
<b>RI</b>	:Replikasyon İndeksi
<b>SCE</b>	:Kardeş Kromatid Değişimi
<b>SSC</b>	:Standart Saline Citrate

## 1. GİRİŞ

Günümüzde gelişen teknolojinin de etkisiyle başta gıda sektörü olmak üzere, kozmetik ve ilaç endüstrisinde de her geçen gün yeni tekniklerle birlikte geliştirilen kimyasal katkı maddeleri piyasada yerini almakta ve insanlar günlük yaşamlarında çok fazla sayıda bu kimyasal maddelere maruz kalmaktadırlar. Özellikle son yüzyılda bir kaç bin kimyasal madde çeşitli amaçlar için birçok sektörde kullanılırken son yıllarda bu kimyasal maddelerin çeşitleri ve sayısı hızla artmakta, yoğun ve kontrolsüz kullanımlarının çevre ve insan sağlığı üzerindeki zararlı etkileri tartışmalara neden olmaktadır.

Resmi rakamlardan elde edilen verilere göre kimyasal maddelerin kullanımının 1930'da 1 milyon ton/yıl, 1950'de 7 milyon ton/yıl, 1970'de 63 milyon ton/yıl, 1985'de 250 milyon ton/yıl'a yükselirken 2000'li yıllarda bu rakamın 400 milyon ton/yıl'a ulaştığı bilinmektedir (Altuğ ve ark. 2000).

Son yüzyılda dünya nüfusunun da hızlı artışıyla birlikte farklı gıda kaynaklarının bulunması insanlar için zorunlu hale gelirken, hızlı endüstrileşme ve kentleşme de hazır yiyeceklere olan talebi arttırmıştır. Bu nedenle gıdaların raf ömrünün uzatılması, uzun süre bozulmadan saklanabilmeleri, gıda sektöründe yeni katkı maddelerinin araştırılması ve bulunması zorunlu hale gelirken, aynı zamanda çevresel kirleticiler tarafından kirletilmemiş mevcut kaynakların da verimli kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla piyasaya sürülen gıda katkı maddeleri, besinlerin hazırlanması sırasında onların içine ilave edilen fakat normal olarak besinin kendi içeriğinde bulunmayan maddelerdir. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğine göre gıda katkı maddeleri "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham veya yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan; seçilen teknoloji gereği kullanılan işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılmasına izin verilen maddeler" olarak tanımlanmaktadır (Boyacıoğlu 2002).

Gıda kodekslerinde belirtilen kullanım düzeylerinin aşılmasıyla oluşabilecek toksikolojik etkiler veya halen birçok katkı maddesi olarak kullanılan kimyasalın sağlık açısından etkilerinin kesinlik kazanmaması piyasaya sürülen bu katkı maddeleriyle ilgili duyulan endişeyi arttırmakla birlikte, bu maddelerin insanlarda biyolojik sistemler üzerine olumsuz etkileri olabileceği ihtimalini de göz ardı etmemek gerekmektedir.

Kullanılan bu gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek miktarda kullanılsalar bile, zaman içerisinde uzun bir süreçte bu kimyasalların vücutta birikerek dokularda tahribata neden olabileceği, dolayısıyla insan sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak tehdit edebileceği göz önünde bulundurulması gereken önemli hususlardır. İşte bu risk nedeniyle gıda katkı maddeleri de dâhil olmak üzere çeşitli maddelerin mutajenik, klastojenik, aneugenik etkileri *in vivo* ve *in vitro* testlerle araştırılmaktadır. Yapılan bir çok araştırmada gıda katkı maddelerinin de içinde bulunduğu pek çok kimyasalın mutajenik etkileri ile kanser oluşturma riski arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır (Kaderlik ve ark. 1992).

Bugün ilaç, gıda, kozmetik endüstrisinde kullanılan her kimyasalın insan sağlığı ve çevreye olan etkisi bilimsel kuruluşlar tarafından ayrıntılı olarak incelenmekte, insan sağlığı ve çevre üzerinde kabul edilemez ölçüde risk taşıyanların kullanımına yasal olarak izin verilmemektedir (Beier 1990; Sarıkaya 2005).

Günümüzde katkı maddelerinin toksikolojik değerlendirilmeleri uluslararası boyutta ele alınan bir konu olup, bu değerlendirmelerde öncelikle akut, genetik ve farmokokinetik çalışmalara yer verilmekte, üreme organlarına olan teratojenik etkileri ile ilgili subkronik denemeler, mutajenik ve kanserojenik etkileri ile ilgili kronik araştırmalar gerçekleştirilmektedir. Her yıl çeşitli toksisite çalışmaları yapılırsa ve çoğunun sağlık açısından kullanımının güvenli olduğu rapor edilse bile bütün katkı maddeleri ile ilgili genotoksik seviyede ayrıntılı çalışma çok az sayıdadır (Soni ve ark. 2005, Mpountoukas ve ark. 2008; Wilma F. ve ark. 2005).



## 1.1. Parabenler

Piyasaya sürülen ürünlerde kullanılan koruyucu katkı maddelerinin ideal bir koruyucu katkı maddesi olarak kabul görmesi için, ürünün formülasyonundaki diğer maddelerle uyumlu, çok düşük bir konsantrasyonda bile çok geniş aralıktaki mikroorganizmalara karşı etkili, toksik ve tahriş edici özellikte olmayan, ürünlerin mikroorganizmalarla bozulmalarını önleyerek uzun raf ömrünü sağlayan özelliklere sahip olması tercih edilmektedir. Bu özelliklere sahip bir koruyucu katkı maddesi olan parabenler 1920'li yıllarda ilk olarak ilaçların içeriğinde katkı maddesi olarak kullanılmaya başlamıştır. Daha sonraki yıllarda gıda ve kozmetik sektöründe yerini alarak ürünlerin içeriğine antimikrobiyal bir katkı olarak eklenmiştir. Özellikle kozmetik ürünlerin %80'inde yaygın olarak kullanıldıkları bilinmektedir.

Ayrıca parabenlerin çok tercih edilmesinde bunların kimyasal stabilitesi (geniş sıcaklık aralığı ve pH), düşük sistemik toksisite göstermeleri, nispeten güvenli kullanımları, üretiminin düşük maliyette olması, ürünlerin renk ve yapısında değişikliğe sebep olmamaları gibi özellikleri gelmektedir (Soni ve ark. 2002, 2005, Terasaki ve ark. 2012).

Parabenler (Para-hidroksibenzoik asit esterleri, E 218); hidroksi benzoik asitin homolog türevleridir. Bakterilerden mantarlara kadar geniş bir spektrumda etkili olan ve özellikle gram pozitif bakterilere karşı diğer katkı maddelerine göre çok daha etkili antibakteriyel özelliğe sahip olan parabenler her geçen yıl çok daha fazla ürünün içeriğinde kullanım imkanı bulmaktadır (Błędzka ve ark. 2014).

Antimikrobiyal bir koruyucu katkı maddesi olarak gıda, ilaç ve kozmetik sektöründe çok yaygın bir kullanım alanına sahip olan parabenler, havada stabil, su ve asidik çözeltilerde hidroliz olmaya karşı dayanıklıdırlar. Kokusuz, tatsız, renksiz, toz halinde kristal formdadırlar. Kozmetik ürünlerde de bulunan bu koruyucu katkı maddeleri, ürünle birlikte insan derisi tarafından doğrudan emilerek kana geçmekte ve hücrelerde zamana bağlı olarak birikmektedir. Bu katkı maddelerinin kullanılması Avrupa Birliği ülkelerinde belirli yasalarla kontrol altında tutulmaktadır. Parabenlerin, koruyucu katkı maddesi olarak kabul görmesindeki diğer bir etken de insanlar için güvenilir olarak kullanılabilen bir

kimyasal olarak tanımlanmasından da gelmektedir. Her ne kadar güvenilir kategorisinde değerlendirilse de ürünlerin içeriğinde bulunması gereken maksimum miktarlar yasal olarak sınırlandırılmaktadır. Örneğin ilaçlarda butil paraben 0,04 mg, metil paraben 1,8 mg maksimum miktarlarda olmak zorundadır (FDA 2013).

Parabenlerin düşük toksik etkiye sahip bileşikler olduğu bilinmesine rağmen, bazı parabenlerin zayıf endokrin bozucu etkilerinin olduğu, bazılarının kadınlarda meme kanserindeki artışta potansiyel bir risk içerdiği ya da malignan melanoma gelişimine yol açtığı bilinmektedir (Darbre ve Harvey, 2008). Bu endişelerin yanında parabenlerin insan hayatının birçok safhasında deri ve solunum yoluyla maruziyetindeki artışın olması, bu bileşiklerle ilgili bazı yasal düzenlemelerin oluşturulmasını gerekli kılmıştır. Bu amaçla, her paraben türevi için bireysel olarak maruziyetin maksimum konsantrasyon olarak 0,4% w/w, piyasadaki ürünlerdeki toplam paraben maruziyet limitinin ise maksimum 0,8% w/w olmasına karar verilmiştir (EU 2009).

Gıdaların içeriğine katılacak olan katkı maddelerinin maksimum miktarlarının belirlenmesinde ilk olarak yapılması gereken şey bu maddelerin günlük kabul edilebilir miktarlarının (ADI) belirlenmesidir. ADI değerlerinin belirlenmesinde toksikolojik testler kullanılmaktadır. Bu testler deney hayvanları üzerinde yapılır ve bu hayvanlarda yan etki oluşturmayan düzey (NOAEL) tespit edilir. NOAEL hayvanın vücut ağırlığının kilogramı başına düşen en yüksek miligram düzeyindeki madde miktarıdır. Bu aşamadan sonra gıdalarda kullanımına izin verilebilecek miktar belirlenir. Güvenlik faktörü denilen ve insanlar üzerinde etkisi olmayacak olan doz saptanmaya çalışılır. Bu aşamada insanlarda deneyler etik nedenlerle yapılamayacağından güvenlik faktörü 100 olarak belirlendikten sonra deney hayvanlarında hiçbir etki göstermeyen doz bu güvenlik faktörüne bölünerek elde edilen değer insanların kullanabilecekleri miktar olarak belirlenir. Yani  $ADI = NOAEL/100$  diyebiliriz. Günlük alınabilecek maksimum miktar (ADI), insanın vücut ağırlığının kilogramı başına düşen miligram madde miktarı olarak belirlenir. Günlük maksimum alım= $ADI \times Vücut ağırlığı$  şeklinde saptanır (Renwiek 1995; Saldamlı ve Uygun 2005).

Örneğin toplam paraben tüketiminin 60 kg'lık bir kişi için 2,368 mg/ kg/ gün olması gerektiği düşünülmektedir. 1974 Gıda Katkı Maddeleri FAO/ WHO Ortak Uzman Komitesine göre parabenin metil, etil and propil esterlerinin ADI değerinin 0-10 mg/ kg vücut ağırlığı/ gün olması gerektiği belirtilmiştir. Bir kişinin günlük ortalama paraben maruziyetinin 76 mg (1,26 mg/kg bw/day) olduğu tahmin edilmekte, bu oranın 50 mg (0,833 mg/kg bw/day)'ı kozmetik ve kişisel ürünlerle, 25 mg (0,417 mg/kg bw/day)'ı farmakolojik ürünlerle, 1 mg (10–13 µg/kg bw/day)'ı ise gıdaların içeriği ile alınmaktadır (Soni ve ark. 2005).

Bu yasal sınırlamalara rağmen günlük yaşamda neredeyse her ürünün içeriğinde bulunan bu katkı maddelerinin yoğun bir şekilde kullanımı, insan sağlığını tehdit eden boyutlarının neler olabileceği konusundaki endişeleri de beraberinde getirmektedir (Mpountoukas ve ark. 2008; Polati ve ark. 2007). Bu nedenle bu maddelerin potansiyel toksik etkileri sadece akut ve dermal toksisite ile sınırlı kalmamalı; bu maddelerin insan hücreleri üzerinde meydana getirecekleri sitotoksik, klastojenik ve mutajenik etkileri de *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla daha geniş bir araştırma konusu olmalıdır (Kaderlik ve ark. 1992).

Gece kremleri ve losyonlar, temizlik ürünleri, yüz, vücut ve el kremleri, nemlendiriciler, göz makyaj ürünleri, şampuan, deodorantlar, saç kremleri, banyo köpüğü gibi 10.000'den fazla kozmetik ürünün içinde kullanılan parabenler, ilaç sektöründe de üretilen ilaçların içeriğinde antimikrobiyal koruyucu olarak kullanım alanına sahiptir. Gıda sektöründe de kullanımı yaygın olup alkollü içecekler, dondurulmuş ürünler, ketçap, mayonez, reçel, jöle, marmelat, meyve suyu gibi birçok gıdanın içinde koruyucu bir kimyasal olarak yaygın bir şekilde kullanılan katkı maddeleridir. Parabenlerin kombinasyonlarının bireysel parabenlerden daha etkili olduğu bilinmektedir. Vücutta metabolize edildikten sonra insan sağlığı açısından zararlı ürünlerinin ortaya çıkabileceği bilinmektedir. Çalışmalar göstermektedir ki parabenler zayıf östrojenik etkilere ve üreme üzerinde yan etkilere sahip bileşiklerdir. Kozmetik yönetmeliğine göre parabenler için yasal sınır tek başına bir ürünün içinde kullanılacaksa %0,4, paraben türevleri ile birlikte kullanılacaksa maksimum %0,8 oranında olmalıdır. Besinlerde bu miktar maksimum % 0,1 oranında olmaktadır (Soni ve ark. 2005; Polati ve ark. 2007).

Parabenlerin temel olarak tüketimi, gıdalarda, kek, pasta vb. ürünlerin içinde % 0,03–0,06 oranında metil ve propil paraben olarak; alkolsüz içeceklerde 0,03–0,05% oranlarında metil ve propil paraben olarak; krem ve macunlarda % 0,1 oranında paraben kombinasyonları şeklinde; şeker, jöle ve konservelede % 0,07 oranında metil ve propil parabenin kombinasyonu olarak; turşu gibi ürünlerde % 0,1 oranında paraben kombinasyonları şeklinde olmaktadır. Parabenlerle ilgili genotoksisite araştırmalarının önemli bir bölümü Ames testi ile yapılmıştır. Ayrıca *in vivo* olarak ratlarda parabenin dozlarının kromozom hasarı ile ilgili etkileri üzerine çalışmalar da bulunmaktadır (Darbre ve Harvey 2008; Soni ve ark. 2002; Soni ve ark. 2005).

Çoğu çalışmada parabenlerin mutajenik ve toksik etkileri olmadığı belirtilse de son zamanlarda yapılan çalışmalarda parabenlerin östrojenik etkiye ve karsinojenik potansiyele sebep olduğuna dair bilgiler bulunmaktadır. Bu durum, kozmetik ürünlerden özellikle koltuk altı deodorantları gibi yaygın olarak kullanılan ürünlerle göğüs kanseri riski arasında bir ilişki olma ihtimalini düşündürmektedir (Darbre 2003, Darbre ve ark. 2004). Özellikle son zamanlarda parabenlerin östrojenik aktivitesi ile ilgili çalışmaların artması, üretici firmaların ürünlerin içeriğinden parabenleri çıkarmasına ve piyasaya sürülen ürünlerin üzerine paraben içermediğine dair bilgilendirici ifadeler yazmalarına neden olmuştur (Oishi 2001; Routledge ve ark. 1998).

Parabenlerin alkil gruplarındaki zincir uzunluğunun antimikrobiyal etki ile doğru orantılı olduğuna bilinmektedir. Örneğin, butil paraben etil parabene göre mikrobiyal gelişimin önlenmesinde çok daha fazla etkilidir (Soni ve ark. 2005). Küf ve mayalara karşı en aktif şekilde etki gösterdikleri için kozmetik sektöründe en çok tercih edilen kimyasal koruyucu bileşiklerdir. Parabenlerin biyolojik sistemlerde birikiminin düşük olması ve bu yüzden güvenilir kategorisindeki katkı maddesi olarak kullanılıyor olmasına rağmen, çeşitli *in vivo* ve *in vitro* testlerde endokrin bozucu özelliğe sahip olduğuna da bilinmektedir (Soni ve ark. 2005, Darbre 2008). Ayrıca metil, etil, propil, butil ve izobutil paraben çok yaygın bir şekilde katkı maddesi olarak kullanılan parabenin esterleri olup, çoğunun *in vivo* ve *in vitro* deney sistemlerinde östrojenik aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir (Routledge ve ark. 1998; Lemini ve ark. 2003). Bu östrojenik aktivite metil

parabenden butil parabene, butil parabenden izobutil parabene, propil parabenden izopropil parabene doğru kimyasalın yapısındaki alkil zincirinin uzunluğuna bağlı olarak artmaktadır. Bütün parabenlerin ana metaboliti p-hidroksi benzoik asittir. Yapılan hayvan çalışmalarında parabenlerin çok hızlı bir şekilde gastrointestinal sistemden kana geçtikleri p-hidroksi benzoik asite dönüşerek vücuttan atıldığına işaret etmektedir. Parabenler ayrıca deriden de çok hızlı bir şekilde emilebilmektedir (Okuba ve ark. 2001; Byford ve ark. 2002; Darbre ve ark. 2002). Ayrıca parabenlerin akciğer tümör dokularında ortalama 20 ng/g konsantrasyonda bulunduğu yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir (Darbre 2004).

Kozmetikte en çok metil ve propil paraben türevleri başta olmak üzere yaklaşık 13.200 formülasyonda (hemen her tip kozmetik ürünüde) paraben denilen katkı maddeleri kullanılmaktadır. Herhangi bir kokusu, rengi olmayışı, ürünlerde bu yönde bir değişime sebebiyet vermeyişi, düşük maliyet, yüksek verimlilik ve genel kabul edirliliği ile kozmetik ürünlerinde de yaygın tercih edilen koruyuculardır (Núñez ve ark. 2008).

Son zamanlarda parabenlerin sağlık üzerinde olumsuz etkileri ile ilgili yapılan çalışmaların da etkisiyle çoğu üründe içeriğinde paraben olmadığına dair yazılar bulunmakta ve risk boyutu ürünlerin içeriğinden bu maddelerin çıkarılmaya başlamasından da anlaşılmaktadır. Danimarkada butil, propil, izobutil ve izopropil parabenin kişisel bakım ürünlerinden ve özellikle 3 yaşın altındaki çocuklarda kullanılan ürünlerden çıkarılmasına dair yasal sınırlamalar getirilmiştir (SCCS 2011).

Diğer yandan, kişisel bakım ürünleri ve kozmetik sektöründe çok çeşitli amaçlarla kullanılmakta olan kimyasal bileşiklerin sayı ve çeşitçe fazlalığı da dikkat çekmektedir. Bunların insan sağlığı açısından test edilmesi amacıyla, her yıl çeşitli toksisite çalışmaları yapılmaktadır. Birçoğunun kullanımının güvenli olduğu rapor edilse de, bütün katkı maddeleri ile ilgili genotoksik seviyede ayrıntılı çalışma sayısı yeterli değildir. Birçok gıda katkı maddesinin ise mutajenik etkiye sahip olduğuna dair çalışmalar ise mevcuttur. (Mpountoukas ve ark. 2008; Wilma ve ark. 2005, Sasaki ve ark. 2002; Arslan 2004; Kaya ve Topaktaş 2007; Yılmaz 2008).

## 1.2. Sitogenetik Yöntemler

Piyasada bulunan çeşitli kimyasal maddelerin, yeni sentez edilmiş olan bileşiklerin ya da insanlar için potansiyel risk taşıma kapasitesi olduğu düşünülen çeşitli maddelerin insanlar üzerindeki genotoksik etkilerinin nasıl olacağının araştırılması kapsamında çeşitli sitogenetik testler kullanılmaktadır. Bir maddenin mutajenik ve genotoksik potansiyeli olup olmadığının belirlenmesinde tek bir test sisteminin yeterli olmadığı, birkaç test sisteminin birlikte kullanılması gerektiği genel kabul gören bir düşüncedir. Özellikle bireysel maruziyet dozunun saptanmasında kullanılan *in vivo* ve *in vitro* olarak uygulanan testlerden en ideal olanı 2 veya daha fazla sayıdaki farklı test sistemini bir arada kullanmaktır. Başta ilaçlar olmak üzere, yeni geliştirilen ve piyasaya sürülen bileşiklerin insan sağlığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde özellikle *in vitro* koşullarda insan lenfosit kültür hücreleri ve bu hücre kültüründe de kardeş kromatid değişimi (Sister Chromatid Exchange=SCE), kromozom aberasyonu (Chromosome Aberration=CA) ve mikronükleus (MN) testleri gibi kısa süreli genotoksikite testleri yaygın bir kullanım alanına sahiptirler (Albertini ve ark. 2000).

### 1.2.1. Sitokinez bloklama mikronükleus testi (CBMN)

Genotoksik etkinin belirlenmesinde Fenech ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemden modifiye edilen Sitokinezi-bloke edilmiş mikro nükleus (CBMN) yöntemi; hücrelerin kimyasal bir maddeye maruz kaldıktan sonra bu kimyasalın genotoksitesinin boyutunun tespit edilmesini sağlayan ve dünya genelinde kabul görmüş ve uygulaması devam eden bir yöntemdir. CBMN yöntemi ile saptanan mikronükleuslar (MN) hücrenin mitoz bölünmesi sırasında meydana gelen, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam bir kromozom yada asentrik kromozom fragmentlerinden köken alan oluşumlardır. MN'lar ya klastojenlerin neden olduğu kromozom kırığı sonucu asentrik kromozom fragmentlerinden ya da aneujenlerin neden olduğu sentromer bölünme hataları ve iğ ipliği fonksiyon bozukluğu sonucu anafaz sırasında geri kalan tam bir kromozomdan oluşurlar. MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu sayısal ve yapısal kromozom düzensizliklerinin indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir. (Fenech ve Morley 1985; Surrallés ve ark. 1995).

MN ilk olarak 1891’de Howell ve Jolly tarafından insan eritrositlerinde tanımlanmıştır. Bu yüzden “Howell-Jolly cisimciği” olarak adlandırılmıştır (Decordier ve Kirsch-Volders 2006).

1950’ li yıllarda bitki hücrelerinde kromozomal hasarın tespit edilmesinde kullanılan yöntem, 1970’lerde Boller ve Schmidt tarafından hayvan hücrelerinde çalışılarak ilk kez mikronükleus testi terimi kullanılmaya başlamıştır. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarla çevresel ajanların genotoksik potansiyellerini belirleyen bir sistem olarak MN testi kabul görmüştür. Daha sonraki yıllarda Hedlle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde, kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (Kirsch-Volders ve ark. 2003).

Genetik hasarın bir göstergesi olan mikronükleusun belirlenmesinde son yıllarda en çok tercih edilen teknik sitokinez engelleme mikronükleus (CBMN) tekniği 1985’de ilk kez Fenech ve Morley tarafından tanımlanmış ve kromozomal hasarın belirlenmesinde hassas ve güvenilir olduğu için dünya genelinde birçok laboratuvarında da kabul görmüştür (Fenech ve Morley 1985). Fenech ve Morley, hücre kültürüne mitoz sırasında sitoplazma bölünmesini durduran aktin polimeraz inhibitörü olan sitokalasin B (Cyt-B) ilave ederek çekirdek bölünmesini tamamlamış, ancak sitoplazmik bölünmesini gerçekleştirememiş iki çekirdekli hücreler elde etmişlerdir (Fenech ve ark. 1999; Kirsch-Volders ve ark. 2003).

CBMN tekniği, ilk olarak insan lenfosit hücrelerinde MN’ların tespiti için geliştirilmiş olsa da günümüzde ağız, burun, bronş ve ürateryal epitel dokularda; tümör, kemik iliği hücresi gibi birçok hücrede uygulanmaktadır (Fenech 2000). Fakat çoğunlukla, farklı genetik hasar tiplerini belirlemek amacıyla kısa zamanlı insan lenfosit kültürü tercih edilmektedir (Fenech ve ark. 1999). *In vitro* uygulamalarda yapay uyarıcı ile mitozu teşvik edilen periferik kan kültürü gibi kısa ya da fibroblast deri kültürü gibi uzun süreli kültürler elde edilir. Kısa süreli periferik lenfosit kültürü ile yapılan sitogenetik testlerin daha hızlı, ucuz, hassas, insan biyolojisine uygun olması, çalışılan dozların küçük miktarlarda bile etkili olması, kolay elde edilen çekirdekli hücrelerle çalışmaya olanak vermesi gibi

çeşitli avantajları vardır. Ayrıca periferik kan lenfositleri, kolay elde edilebilir olduklarından tarama çalışmalarında kullanmak için uygun hücrelerdir.

Karsinogenlere maruz kalmış bireylerde, artan kanser riskini göstermek amacıyla bu dokulardaki morfoloji bozukluğunu, kromozom kırıklarını, premalign değişikliklerini belirlemek için MN testi yapılabilmektedir (Demirel ve Zamani 2002). Mikronükleus oluşumlarının kromozomlardaki aberasyonların dolaylı bir göstergesi olduğu da bilinmektedir (Albertini ve ark. 2000). Ayrıca, Fenech ve ark. (1999) yaptıkları bir çalışmada insanlarda MN ile kanser arasındaki ilişkiyi açıkça göstermişlerdir.

CBMN Tekniğinde, lenfosit hücrelerinde hücre bölünmesi fitohemoglutinin (PHA) ile uyarıldıktan sonra ilk çekirdek bölünmesini geçiren hücrelere, 44. saatte sitokalsin-B (cyt-B) ilave edilerek sitokinez engellenir, ortamdaki iki çekirdekli (binükleat, bn) hücrelerde mikronükleuslar belirlenir. (Fenech ve Morley 1985; Norppa ve Falck 2003). Cyt-B, aktin polimerizasyonunu inhibe eden, *Helminthosporium dematiadeum*'dan elde edilen bir ekstretdir. Hücre bölünmesini, sitokinez evresinde aktin filamentlerinin ucuna bağlanarak ve aktinin polimerize olmasını engelleyerek durdurur.

CBMN tekniğinde, her örnek için 1000 iki çekirdekli hücredeki mikronükleuslar sayılır (Fenech 2000).

CBMN testi sadece mikronükleusların belirlenmesini sağlamaz. Ayrıca;

-Nükleoplazmik köprülerin (NPB)

-Gen amplifikasyon belirteçlerinin (NBUD)

-Hücre bölünmesi inhibisyonunun

-Nükleer bölünme indeksinin

-Nekrozis ve apoptozisin de belirlenmesini sağlamaktadır (Mateuca ve ark. 2006).

İnsan lenfositlerinde CBMN sonuçlarının toplandığı ve karşılaştırıldığı İnsan Mikronükleus Projesi (HUMN) adıyla bilinen uluslararası bir veri bankası vardır. Bu veri bankasında dünya genelinde 30'dan fazla laboratuvarın CBMN tekniği ile ilgili yapılmış çalışmaların verileri toplanmaktadır (Fenech ve ark. 2003).



CBMN yönteminde elde edilen binükleat hücrelerdeki mikronukleusları sayarken Fenech ve ark. (2003) tarafından Human Micronucleus Project (HUMN) kapsamında belirlenen sayım kriterleri kullanılmaktadır. Bu kriterler aşağıda sıralanmıştır:

- MN'ler morfolojik olarak tek tip olup, nükleus daha küçüktür. MN aşağıdaki özelliklerle karakterize edilebilmektedir:
- Lenfositlerdeki MN çapı ana çekirdek çapının 1/16'sı ile 1/3'ü arasındaki değerlerdedir. MN'nin alanı, ana çekirdeklerin alanının 1/256 ile 1/9' u arasındadır.
- MN'ler oval veya küreseldir, asla dörtgen olmamalıdır.
- MN'ler kolaylıkla boya gibi artefaklardan ayrılabilirler.
- MN'ler ana nükleusa bağlı değildir.
- MN'ler ana çekirdeğe dokunabilirler, eğer sınırlar ayrılabilirse ana nükleusun üstünde olabilirler.
- MN'ler genellikle ana çekirdekle aynı yoğunlukta boya alırlar. Fakat bazen ana nükleus daha koyu boyanabilir.

CBMN tekniğinde iki çekirdekli (binükleat) hücrelerinin de hesaplama kriterleri bulunmaktadır. Bu kriterlere göre:

- Hücreler iki çekirdekli olmalı.
- İki çekirdekli hücrelerdeki çekirdekler bozulmamış bir çekirdek membranına sahip olmalı ve aynı sitoplazmik sınırlar içinde bulunmalı.
- İki çekirdekli hücrelerdeki çekirdekler yaklaşık aynı büyüklükte olmalıdır. Bu nükleusların boyama yoğunluğu da aynı olmalıdır.
- İki çekirdekli hücredeki çekirdekler nükleoplazmik köprü ile bağlanmış olabilir. Bu köprü çekirdek çapının 1/4 'ünden daha büyük olmamalıdır.
- İki çekirdekli hücredeki çekirdekler birbirine dokunabilir. Ama birbirlerinin üstünde olmaması istenmektedir. Eğer çekirdeklerin sınırları belirlenebiliyorsa bu durumda hesaba alınabilir.
- Sitoplazmik sınır veya iki çekirdekli hücrenin membranı bozulmamış olmalıdır. Komşu hücrenin sitoplazmik sınırından açıkça ayrılabilirdir (Fenech ve ark. 2003).

### 1.2.2. Kardeş kromatid değişim testi (SCE)

Gelişen teknoloji ile üretilen yeni kimyasal maddeler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, tarımda kullanılan çeşitli kimyasal maddeler gibi pek çok çevresel faktör canlıların genetik yapısında mutasyon oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu maddelerin DNA'da oluşturabileceği hasarı kromozom düzeyinde tespit etmemizi sağlayan doğrudan ve en hassas metodların birisi de kardeş kromatid değişimi (SCE) analizidir.

Kardeş kromatid değişimi Taylor ve arkadaşlarının 1958 yılında bitki mitotik kromozomlarında (*Vicia faba* ve *Bellenalia romana*) DNA replikasyonu konusunda yaptığı otoradyografik çalışmalarla gözlemlemiştir (Taylor 1958).

Perry ve Wolf, 1974 yılında kromatin yapısına Giemsa boyasının girişini BrdU'nin kısıtladığını göstermişlerdir. Bu bilgiler doğrultusunda yeni bir teknik geliştirerek (Fluoresans boya + Giemsa tekniği= FPG) otoradyografiye gerek kalmaksızın gösterilebilmişlerdir (Perry ve Wolf 1974).

Çin Hamster fibroblast hatları, HeLa gibi insan hücre hatları, deri ve akciğerden alınmış insan hücreleri, fare, sıçan, tavşan gibi laboratuvar hayvanlarının ve insanların lenfosit kültürleri gibi birçok hücre tipinde SCE yaygın olarak çalışılmaktadır. Kardeş kromatid değişimi çoğalan hücrelerde spontan olarak meydana gelebilmektedir. Ancak çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlar kromozom DNA'sında meydana gelen, replikasyon sırasında onarılamayan hatalar SCE'nin ortaya çıkmasına ya da artmasına yol açmaktadır. Bu yüzden pek çok mutajenik ya da karsinojenik etkileri göstermede duyarlı bir parametre olarak kabul edilmektedir.

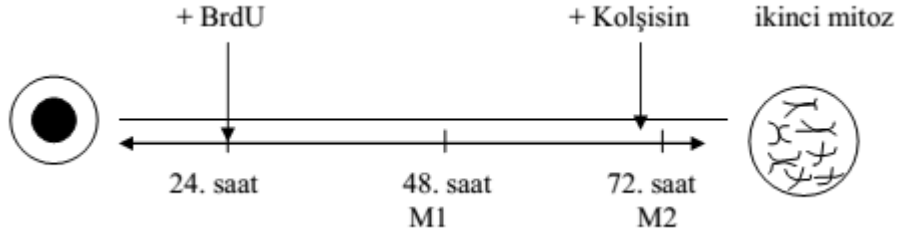
SCE yöntemi genotoksik potansiyel riski taşıdığı düşünölen çeşitli kimyasal mutajen ve karsinojenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılan sitogenetik uygulamalardandır. Kanser gibi hastalıklarda, SCE frekansında artış olduğu yapılan çalışmalarla bilindiği için, mutajenlere maruziyet sonucu oluşabilecek hasarların belirlenmesinde sıklıkla tercih edilen bir metod olarak kullanılmaktadır. Çeşitli mutajenik maddeler alkilleyici özellikleri ile (mitomisin C, nitrojen mustard gibi) kromatid kırıklarını ve değişimlerini indüklemektedirler (Hagmar ve ark. 1998; Üstündağ 2004).

SCE testinde, kromozom morfolojisinde bir değişme olmadan bir kromozoma ait iki kromatidin homolog bölgelerindeki kırılan parçaları karşılıklı yer değiştirdikten sonra tekrar birleştiği için, bu test sistemi DNA'da meydana gelen ve sonra tekrar birleşen kırıkların tespit edilmesini sağlamaktadır. Lenfosit hücreleri hücre döngüsünün G0 evresinde olduklarından, SCE testi için inkübasyona alınan lenfositlerin gerekli olan iki hücre döngüsünü geçirmiş olmaları için fitohemaglutinin (phytohaemaglutinin) denilen bir antijenle bölünmeleri uyarılır. Bu sayede gerekli sayıda mitotik hücre elde edilebilmektedir. SCE testinde hücreler inkübasyonun başında bir timin analogu olan BrdU (bromodeoksiüridin) ile mitoz sırasında muamele edilir. DNA sentezi BrdU varlığında devam eder ve yeni oluşan DNA'da timin yerine BrdU girer. Böylece her bir kromatid, bir timinli ve bir de BrdU'li DNA zinciri içerir. Mitoz sonrasında her bir kromatid farklı bir kardeş hücreye gider. İnkübasyonun 48. saatine gelindiğinde lenfositler ikinci mitozun metafazındadırlar. Bu noktada ortama kolşisin eklenerek iğ ipliklerinin bozulması sağlanmaktadır. Böylece bizim elimizde ikinci mitozunda bulunan bir kromatidi eski bir kromatidi yeni olan kromozomları içeren metafaz plakları bulunmaktadır. BrdU'nin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesinin ardından, flöresan ışık altında ışınlanıp giemsa ile boyandığında eski DNA zinciri boyanırken BrdU içeren yeni DNA kolları boyayı tutamamakta ve açık renk görülmektedir. Sonuçta ikinci mitozda kromozomun bir kolu açık iken diğer kolu koyu renklidir. Ancak kimyasal maruziyeti sonucunda DNA'da herhangi bir kardeş kromatid değişimi olmuşsa kollarda açıklı koyulu alanlar bulunur (Natarajan 2002; Wilcosky ve Rynard 1990).

Genotoksik bir maddeye maruz kalınıp kalınmadığını belirlemek amacı ile kullanılan ve kromozom morfolojisini değiştirmeyen yalnızca parça değişim esasına dayanan SCE yöntemi, küçük oranlardaki maruziyetleri bile tespit edebilecek düzeyde yüksek bir hassasiyette olduğu için çok kullanılan sitogenetik test metodlarından ( Hagmar ve ark. 2001).

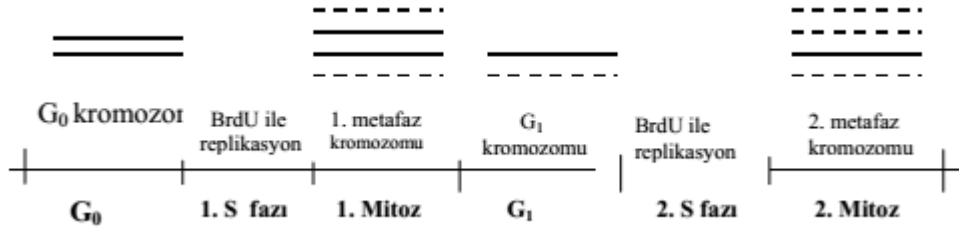
Periferal kan lenfositleri hücre siklusunun G0 fazında iken lenfositleri stimule etmek amacıyla spesifik bir antijen olan fitohemaglutinin kullanılarak

bölmeleri sağlanır. Fiksasyondan hemen önce hücre bölünmesini metafazın 2. mitozunda durdurmak amacı ile kolşisin ilave edilir.



**Şekil 1.1.** Lenfositlerin 72 saatlik inkübasyon süresinin farklı aşamaları.M1:1. mitoz, M2: 2. Mitoz aşamaları ve BrdU ile kolşisinin ilave edilmesi (Üstündağ 2004)

BrdU, kromatidlerin tek bir DNA sarmalın yapısına katılması sonucu mikroskopta görülen renk daha koyu olurken, kromatidlerin her iki DNA sarmalının yapısına katılması rengin daha açık görülmesine neden olur.



**Şekil 1.2.** Hücre bölünmesi esnasında kromatidlerin farklı tonlarda boyanma mekanizması (Wulf 1989)

SCE, S fazında meydana geldiğinden dolayı, DNA replikasyonu sırasında etkili olan ve DNA hasarı oluşturan kimyasallar SCE'leri indükler. Bu kimyasallar CA'larına göre daha düşük konsantrasyonlarda SCE'lere neden olurlar. SCE'lerin, nokta mutasyonları, gen amplifikasyonları ve sitotoksositeye neden olabilecekleri bilinmektedir. Mutajen ve kanserojen olduğu bilinen maddelere maruz kalan insan ve hayvanların hücrelerinde SCE frekansının arttığı ve tek-gen mutasyonlarının artışı ile SCE frekansı arasında doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır (Carrano ve ark. 1978; Albertini ve ark. 2000).

SCE frekansını etkileyen kültür koşulları ile de ilgili birçok sebep bulunmaktadır. Örneğin BrdU konsantrasyonu yüksek dozda hücre kültürüne

eklenirse, mitotik indekste azalmalara ve SCE frekansında beklenenden fazla artışlara neden olmaktadır. Kültür ortamının sıcaklığındaki değişimler, farklı besi yeri koşulları, BrdU ışıktan etkilendiği için kültür ortamının ışıktan korunamaması, kolşisin konsantrasyonu gibi çeşitli faktörler SCE frekansını etkilemektedir.

### **1.2.3. Kromozom aberasyon testi (CA)**

*In vitro* kromozom anormalliği (CA) testi, genellikle insan periferal kan lenfosit hücrelerinin kullanıldığı, test bileşikleri tarafından indüklenen yapısal ve sayısal kromozom anormalliklerin ve dolayısıyla genotoksik risklerin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan çok hassas yöntemlerden birisidir. Kromozom aberasyonları, hücrelerin bölünmesi sırasında kendiliğinden ya da mutajen, klastojen olduğu tahmin edilen bir ajanın etkisi ile meydana gelen kromozom yapısı ve sayısında meydana gelen değişikliklerdir. Bu test tekniğinde, kültüre alınmış periferal kan lenfositlerinde kromozomal anormallik sıklıklarının değerlendirilmesi ile genotoksik hasarın boyutunun belirlenmesi sağlanmaktadır. Yapısal kromozom aberasyonları iki tipte oluşur, bunlar kromozom tipi ve kromatid tipi aberasyonlardır. Kimyasal mutajenlerin büyük bir kısmı kromatid tipi aberasyonları oluştururken, bir kısmı kromozom tipi aberasyonları da oluşturmaktadır. Kromozom aberasyon frekansı epidemiyolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılan ve erken kanser riskinin teşhisinde belirleyici role sahip bir biyomarkırdır. İnsan popülasyonları üzerinde yapılan çalışmalar, periferal lenfositlerdeki spontan kromozomal anormallik frekanslarındaki artış ile kanser oluşumu arasında pozitif korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır (Çakmak 2000; Bonassi ve ark. 2000). Bu test, insan periferal lenfositlerinin *in vitro*'da önce fitohemoglutinin (PHA) ile bölünmeye teşvik edilmesi, inkübasyonun 70. saatinde kolşisin veya kolsemid gibi inhibitörlerce hücrelerin metafazda tutulması esasına dayanmaktadır.

Kromozomal aberasyon tekniğinde kolşisin eklenmesi sonucu hücreler metafaz aşamasında tutulmakta, bu sayede kromozomların kolayca gözlenebilmesi sağlanmaktadır. Çoğu kimyasal madde, hücreler DNA replikasyonunu tamamlarken etkisini gösterirler ve kromozomal anormalliklere

neden olurlar. Bu nedenle anormalliklerin oluşumunu gözleyebilmek için testler yapılırken, kimyasal madde uygulanmasından sonra verilen süre iyi ayarlanmalıdır. Çünkü zarar görmüş hücreler anormallik oluşumundan sonra bir veya iki hücre siklusundan daha fazla yaşayamazlar. Bu nedenle, genotoksik araştırmalar, kimyasal madde uygulamasından sonraki ilk metafazda yapılmalıdır (Çelik 2003).

Periferel kan lenfositlerinde, iyonize radyasyon ve çeşitli klastojenik kimyasallar gibi ajanlar kromozom tipi aberasyonlara yol açarken, UV ışını ve kimyasal klastojenleri içeren ve S fazına bağlı ajanlar da kromatid tipi aberasyonlara sebep olmaktadır (Albertini ve ark. 2000).

İnsan popülasyonları ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ışığında, periferel lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu yöntemle incelenebilen yapısal aberasyonlar; kromatid kırığı, kromozom kırığı, fragment, disentrik kromozom, halka kromozom, kardeş kromatidlerin birleşmesi (sister union), translokasyon, izokromozomdur (Hagmar ve ark. 1994; Bonassi ve ark. 1995).

**a) Kromatid kırığı:** Bir kromozomun iki kromatidinden yalnızca birinde kırılma olur ve anafazda kromatidlerin kutuplara çekilmesi sonucu hücrelerden biri defisyensli kromozom bulundurur.

**b) Kromozom kırığı:** Bir kromozomun her iki kromatidinde aynı noktada kırılma olur. Bu durumda hücrelerin ikisi de defisyensli kromozom bulundurur.

**c) Disentrik kromozom:** Kromozom kırığı meydana geldiği zaman, sentromer içeren parçanın kopuk uçlarının birleşmesi sonucu disentrikkromozomlar oluşur. Birbirine yakın kromozomlardaki basit kırıklarda, kırık uçlar tekrar birleşebilmekte ve kromozomların yeniden düzenlenmesi sonucu iki sentromerli (disentrik) kromozomlar ortaya çıkmaktadır.

**d) Kardeş kromatidlerin birleşmesi:** Kromozom kırıklarının olduğu durumlarda yaralı kardeş kromatidlerin kırık olan uçlarının birleşmesidir. Diğer bir adı sister union' dur. Mitozun anafazında bu kromatidler zıt kutuplara çekilirken kromozom köprüsü oluştururlar. Kardeş kromatidlerde birleşme,

çoğunlukla kromozom uçlarında meydana gelen terminal delesyonlar sonucunda oluşan kromozom kolları arasındaki karşılıklı birleşmedir.

e) **Halka kromozomu:** Bir kromozomun iki ucunda da meydana gelen kromozomal kopma sonucu oluşan yaralı uçların birleşmesi ile halka (Ring) kromozomlar oluşur. Bu kromozomların kardeş kromatidlerinin zıt kutuplara çekilmesi sonucu her bir hücrede bir halka kromozomu bulunur (Topaktaş ve Rencüzoğulları 1995).

### 1.3. Yapılmış Genotoksisite Çalışmaları

Parabenlerle ilgili şimdiye kadar birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen genotoksisite ile ilgili insan lenfosit hücrelerinde *in vitro* bir çalışmaya rastlanmamıştır. Paraben dışında kullanılan katkı maddeleriyle ve potansiyel genotoksik etkisi olduğu düşünülen maddeler ile ilgili yapılmış olan ve bizim kullandığımız testleri içeren çalışmalar ise literatürde mevcuttur. Bu çalışmalardan birisinde renklendirici, koruyucu, antioksidant, fungusit ve tatlandırıcı olarak kullanılan 39 kimyasalın genotoksik etkisi test hayvanlarında karaciğer, mide, kolon, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği dokusunda araştırılmış ve bunlardan bazılarının sindirim sistemi organlarında DNA'da hasara yol açtığı saptanmıştır (Sasaki ve ark. 2002).

Günümüzde yapılan genotoksisite çalışmalarının yoğunlaştığı pek çok alan bulunmaktadır. Örneğin piyasaya sürülen ve her geçen gün sayısı artan çeşitli gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri (Canımoğlu ve Rencüzoğulları 2006; Sarıkaya ve Solak 2003), havasal kirletici egzoz gazlarının insanlar üzerindeki karsinogenik etkileri (Zhang ve ark. 2007), insan kişisel bakım ürünlerinden diş beyazlatıcı olarak kullanılan ürünlerin genotoksik etkileri (Munro ve ark. 2006) gibi pek çok alanda insan yaşamını etkileyen çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik potansiyeli çalışılmış olup literatürde mevcut bulunmaktadır.

Piyasaya sürülen ilaçların genotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, içinde antikanser ilaçların da bulunduğu 46 ilacın genotoksisitesi rapor edilmiştir. Buna göre SCE frekansında önemli derecede pozitif sonuçlar elde edilirken, memeli mutajenez çalışmasında düşük oranda pozitif sonuç elde edilmiştir. Bazı

ilaçların hem genotoksik hem de karsinojenik olduğu belirlenmiştir (Snyder ve Gren 2001).

Flukunazol denilen antifungal bir ilaç ile insan lenfositlerinde yapılan çalışmada; bu ilacı kromatid, kromozom kırıkları, poliploidi, disentrik kromozomlar, kromatid değişimleri, yapısal veya sayısal kromozom aberasyonlarına yol açtığı tespit edilmiştir. İnsan lenfositlerinde bu ilacın klastojenik ve aneujenik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (Yüzbaşıoğlu ve ark. 2008).

Pestisitlere maruziyetin genotoksik boyutunun araştırıldığı bir çalışmada, CA, SCE ve MN testi birlikte uygulanmış ve bu üç testte de kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında CA, SCE ve MN frekansında belirgin oranda artış olduğu gözlenmiştir (Ergene ve ark. 2007).

Bir antikanser ilacı olan doxorubicin ile ilgili yapılan bir çalışmada CBMN tekniği sonuçlarına bakıldığında, MN frekansında doza bağlı olarak istatistiki açıdan anlamlı bir artış olduğu görülmüş; nekrotik hücre sayısının da arttığı gözlenmiştir. Bu ilacın klastojenik ve anojenik etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Dhawan ve ark. 2003).

Sulfamethoksazol antimikrobiyal ilacıyla kültüre edilmiş insan periferik lenfositleri kullanılarak yapılan bir çalışmada SCE ve MN frekansları incelenmiş her iki test de DNA hasarı, klastojenite ve anojenite gibi genetik hasarların saptanmasını sağlamaktadır. SCE ve MN frekanslarında en yüksek dozlarda artış görülmüş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Abou-Eisha 2004).

Megazol adlı ilacın genotoksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada mitotik indeks ve kromozom anormalliği sıklığında anlamlı düzeyde artış görülmüştür (Nesslany ve ark. 2004).

Violasein denilen bir antibiyotikle memeli hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada MN frekansında artışa neden olduğu belirtilmiştir (Andrighetti-Frohner ve ark. 2005).

Uyku ilacı olarak kullanılan kloral hidratın çocukların periferik lenfositleri üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, bu ilacın SCE ve MN frekansında



anlamli bir artisa neden olduğu ve genotoksik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (İkbal ve ark. 2004).

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

Antimikrobiyal bir ilaç olan enrofloksasin ve metaboliti siprofloksasin kullanan bireye ait kültürdeki insan periferal lenfositlerinde mitotik indeks ve kromozom anormallikleri incelenmiş ve kromozom anormallik frekansında her iki grupta da kontrole göre istatistiksel olarak önemli bir artış olduğu ve en sık kromatid ve kromozom kırıkları anormalliklerinin görüldüğü bundan da ilaçların genotoksik olduğu sonucuna varmışlardır. Kontrolle kıyaslandığında mitotik indekste görülen azalma ise bu antimikrobiyalin sitotoksik etkili olduğunu göstermektedir. Enrofloksasin ayrıca SCE frekansını da arttırdığından bu ilacın genotoksik etkili olduğu saptanmıştır (Gorla ve ark. 1999).

Loretz ve arkadaşları da, yaygın olarak kullanılan bazı kozmetik ürünleri ve içeriğindeki katkı maddeleri rapor ederek, bu ürünlerin sağlık açısından önemini tartışmıştır (Loretz ve ark. 2005).

Gıda katkı maddesi olan potasyum sorbatın genotoksik etkileri insan lenfosit hücre kültürü üzerinde (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik dozlarda) bizim çalıştığımız testlerden olan kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi, mikronukleus testi ile de çalışılmıştır. Ayrıca DNA hasar tespiti comet testiyle de desteklenmiştir. Kromozom aberasyonlarının, kardeş kromatid değişimlerinin ve mikronukleus sayısındaki istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği görülmüş, comet testinde de tüm dozlarda DNA hasarı olduğu bildirilmiştir. Hücre proliferasyon indeksi ve replikasyon indeksindeki azalma ise anlamlı bulunmamıştır (Mamur ve ark. 2010).

Unlarda beyazlatıcı olarak kullanılan potasyum bromatla ilgili yapılan bir genotoksisite çalışmasında, bu maddenin 24 ve 48 saatlik periyotlardan sonra CA ve SCE'yi indüklediği, hücre proliferasyon indeksine ve MI (mitotik indeks)'i azalttığı görülmüştür. 48 saatlik süreç boyunca bütün dozlarda MN oluşumunun

meydana geldiği belirlenmiş ve *in vitro* sonuçlara göre potasyum bromatın insan kültür hücre sisteminde önemli bir genotoksisiteye sahip olduğu sonucuna varılmıştır (Kaya ve Topaktaş 2007).

Göğüs kanserli hastalarda iyonize radyasyonun DNA hasarı üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, CBMN testi sonuçlarından elde edilen veriler ışığında hücrelerde MN frekansında kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında yüksek oranda artış olduğu belirlenmiştir (Fenech 2002).

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

Gıdalarda koruyucu olarak kullanılan bazı kimyasal maddelerin *Allium cepa* üzerinde sitotoksik etkili olduğu ve kromozomal anomalilere yol açtığı gösterilmiştir (Erdoğan 2008). Diğer bir çalışmada ise, bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri *in vitro* insan periferal kan lenfositlerinde, kromozom aberasyon (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE), mikronükleus (MN) ve comet testleri kullanılarak belirlenmiştir. Test maddesi olarak kullanılan katkı maddelerinin tamamının yapısal kromozom anomalisi, kardeş kromatid değişimi ve mikronükleus frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı, comet testi sonuçlarına göre de DNA hasarının indüklendiği görülmüştür (Yılmaz 2008).

Bir antikanser ajanı olan gemsitabinin insan lenfosit hücreleri üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada bu maddenin kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişim frekansını anlamlı bir şekilde arttırdığı, replikasyon indeksi ve mitotoik indeksi de önemli derecede düşürdüğü rapor edilmiştir. Bu maddenin doza bağlı olarak sitotoksik ve genotoksik etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Aydemir ve ark. 2005).

Bir fungusit ile lenfosit hücrelerinde yapılan bir çalışmada ise, bu maddenin genotoksik ve sitotoksik etkileri nelenmiş, CA testinde anlamlı artışlar olduğu görülürken, MN testinde anlamlı sonuçlar elde edilememiş, SCE testinde ise dozdan bağımsız artış olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bu maddenin doza bağlı

olarak yüksek dozlarda proliferasyon indeksini anlamlı bir şekilde düşürdüğü de rapor edilmiştir (Sivikova ve ark. 2013).

Yapılmış başka bir çalışmada trans-resveratrol denilen ve üzümde doğal olarak bulunan ve antioksidan, antikanserojen olarak bilinen bir maddenin *in vitro* sitotoksik ve genotoksik etkisi lenfosit hücrelerinde incelenmiştir. Radyasyona bağlı olarak oluşan kromozom hasarının bu maddenin tüm dozlarında azaldığı görülmüştür. Tüm konsantrasyonlarda SCE frekansı artarken, düşük konsantrasyonlar proliferasyon ve mitotik indeks artarken, yüksek konsantrasyonlarda bu değerlerin düştüğü belirlenmiştir (Sebestia ve ark. 2013).

Kadmiyum klorürün lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, doza bağlı olarak kromozom aberasyonların arttığı, yüksek dozların sitotoksik etki göstererek hücre büyümesini inhibe ettiği sonucuna ulaşılmıştır (Gateva ve ark. 2013).

Antienflamatuvar ve antikarsinojenik özelliklere sahip olduğu bilinen kurkumin maddesinin insan lenfosit hücreleri üzerindeki genetik hasar boyutunun incelendiği bir çalışmada, yüksek konsantrasyonlar kromozom aberasyonlarının indüklendiği görülürken, kardeş kromatid değişimlerinin istatistiki olarak anlamlı çıkmadığı gözlenmiştir. Bu maddenin insan lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Sebestia ve ark. 2012).

Kemoterapide kullanılan pemetrexed (PMX) ve cefixime (CFX) ilaçlarının bir kombinasyonu insan lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik ve sitotoksik potansiyelleri açısından bir çalışmada incelenmiştir. PMX + CFX'nin birlikte kullanımının CA, SCE ve MN testlerinde herhangi anlamlı bir artışa sebep olmadığı görülürken, mitotik indeks, proliferasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksini anlamlı bir şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak bu iki ilacın kombinasyonunun lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etkiye yol açmadığı ancak sitotoksik etkili olduğu rapor edilmiştir (Istifli ve Topaktaş, 2015).

Gıdalarda renklendirici olarak kullanılan tartrazin, eritrozin ve amarant'ın insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik, sitotoksik ve sitostatik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, amarant'ın ve eritrozin'in en yüksek dozda yüksek genotoksik, sitotoksik ve sitostatik etkilerinin olduğu görülürken, tartrazainin de

farklı konsantrasyonlarda sitotoksik ve sitostatik etkiye sahip iken herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında bu gıda renklendirici katkı maddelerinin lenfosit hücreleri üzerinde potansiyel toksik etkiye sahip oldukları sonucuna ulaşılmıştır (Mpountoukas ve ark. 2010).

Gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan aspartam maddesiyle ilgili olarak Rencüzoğulları ve ark. (2004) 'nın yaptığı çalışmada, 500, 1000 ve 2000 µg/ml aspartam ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde aspartam'ın SCE oluşumunu indüklemeyen, hem CA hem de MN sayısını artırdığı ve sitotoksik bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu çalışma bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Çünkü SCE'de etkili olup da CA'da etki göstermeyen ya da MN'de herhangi bir etki göstermeyen dozların CA'da etkili olduğu görülmüştür.

Sodyum bisülfitle yapılan in vitro bir çalışmada, bu maddenin insan lenfosit hücreleri üzerinde kromozomal aberasyonlarını, kardeş kromatid değişimini ve mikronükleus oluşumunu doza bağlı olarak artırdığı, mitotik aktivitenin ise doza bağlı bir düşüşe yol açtığı saptanmıştır (Meng ve Zhang, 1992).

#### **1.4. Parabenlerle İlgili Yapılmış Çalışmalar**

Methyl ve propil parabenin mutajenik etkisini incelemek için yapılan bir çalışmada, Ames testi ile *Salmonella typhimurium*' un TA98, TA100, TA1535, TA1537 suşlarında S9 enzim sistemi varlığı ve yokluğunda bu maddelerin mutajenik etkisi incelenmiştir. Sonuç olarak herhangi bir mutajenik etkiye sahip olmadıkları görülmüştür ( Litton Bionetics, 1974).

Propil parabenin mutajenik etkisini incelemek için yapılan AMES testinde 10-2000 µg/plaka'lık dozda S9 varlığı ve yokluğunda bu katkı maddesinin nonmutajenik olduğu görülmüştür (McCann ve ark. 1975).

Parabenlerle sıçanlarda yapılan bir çalışmada bir dizi östrojenik aktiviteye sahip oldukları Routledge ve ark. (1998) tarafından rapor edilmiştir

Propil paraben ve bütül paraben ile yapılan çalışmalarda bu maddelerin genç erkek sıçanlarda düşük epididim ve seminal vezikül ağırlığına, düşük sperm

üretimi ve testosteron düzeyi gibi olumsuz üreme etkilerine neden olabileceği belirtilmiştir (Oishi 2001, 2002).

Dişi sıçanların olgunlaşma periyodunda bazı paraben türevlerinin etkilerinin incelendiği bir çalışmada, parabenlerin üreme organları üzerinde histopatolojik anormalliklere yol açtığı belirlenmiştir (Vo ve ark. 2010).

Okuba ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada (2001), bazı paraben kombinasyonlarının östrojenik etkisi MCF-7 hücreleri üzerinde östrojen reseptör bağımlı proliferasyon testi ile incelenmiştir. Sonuç olarak, parabenlerin ER'ye bağımlı östrojenik etkisinin olduğu ve bazı paraben kombinasyonlarının hücre içi sinyal yolağında gen ekspresyonunu etkileyebileceği rapor edilmiştir (Okuba ve ark. 2001).

Anderson (2008) etilparaben ve metilparabenin Çin hamster yumurtalık hücrelerinde kromozomal aberasyonların artışına yol açtığını rapor ederken, bu maddelerin genel olarak mutajen olmadığını bildirmiştir.

Yapılan bir çalışmada, propil ve butylparaben'in CHO-K1 hücrelerinde doza bağlı olarak DNA hasarı meydana getirdiği comet testiyle ölçülmüş ve kardeş kromatid değişimi (SCE) ve kromozom aberasyonunu (CA) indüklediği belirlenmiştir (Tayama ve ark. 2008).

Diğer bir çalışmada, propil parabenin, memeli hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi incelenmiştir. Propil parabenin maymun karaciğerinden alınan hücrelerdeki toksik etkisi için 50µM -500µM (9,01 µg/ml ile 90,1 µg/ml) aralığındaki dozları kullanılmıştır. Doza bağlı olarak hücreler üzerinde bu maddenin sitotoksik etkisinin olduğu görülmüştür. Hücre proliferasyonunda doza bağlı olarak azalmaya, sitotoksik olarak da DNA'da çift iplik kırıkları ve oksidatif hasara sebep olduğu rapor edilmiştir. Parabenlerin genotoksik etkisi üzerine memeli hücrelerinde daha fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu üzerinde durulmuştur (Martin ve ark. 2010).

Bazı çalışmalar parabenlerin lenfosit hücrelerinde lizozomal enzimlerin salgılanmasını etkileyebileceğini (Biarati ve ark. 1994), sıçan hepatositlerinde mitokondriyel fonksiyonu azalttığını (Nakagawa ve Moldeus 1998), CHO hücrelerinde DNA hasarına sebep olabileceği (Tayama ve ark. 2008) ve

keratinositlerde UV ile indüklenen hasarını etkinleştirebileceğini öne sürmektedirler (Darbre ve ark. 2004).

Parabenlerin sitotoksik etkisi sıçan hepatositlerinde hücre canlılığı, ATP miktarı, toplam adenin nükleotid seviyesi ve mitokondriyel membran potansiyeli açısından 90-360 mg/l konsantrasyon aralığında değerlendirilmiştir. Sitotoksikite 60 dakikalık inkübasyonda belirlenmiş ve metil ve etil parabenin çok düşük toksik etki gösterirken, propil ve izopropil parabenin orta derecede toksik etkili olduğu görülmüştür. Butil ve izobutil parabenin ise yüksek oranda ATP kaybına yol açarak ve hücrelerin % 98' ini öldürerek yüksek sitotoksik etki gösterdiği gözlenmiştir (Nakagawa and Moldeus 1998).

Propil parabenin hela hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin incelendiği bir çalışmada 0,22 mM (0,22 mM= 40 µg/ml) dozun IC50 değeri olduğu anlaşılmıştır (Sheu ve ark. 1975).

Parabenlerin östrojenik aktivitesine bağlı olarak yapılmış olan bir çalışmada, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etki sonuçlarına göre;  $(1-2) \times 10^{-4}$  M ( Butil paraben için  $10^{-4}$  M =19,42 µg/ml ve  $2,10^{-4}$  M=38,85 µg/ml, propil paraben için  $10^{-4}$ M= 18,02 µg/ml,  $2,10^{-4}$  M=36,04 µg/ml) konsantrasyonlarda bütül ve propil parabenin akciğer kanser hücrelerini öldürdüğü, etil ve metil parabenin ise sahip oldukları alkil grubuna bağlı olarak  $10^{-4}$  M konsantrasyonda bu hücreler üzerinde daha düşük toksik etki gösterdiği görülmüştür (Byford ve ark. 2002).

Parabenlerin endoplazmik retikulumdan bağımsız bir mekanizmayla homeostasiyi değiştirebildiği bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre MCF-10A denilen ölümsüzleştirilmiş insan meme epitel hücrelerinin  $10^{-6}$  M ve  $10^{-7}$  kadar düşük konsantrasyonlarda büyüme yönünde uyarıldığı belirlenmiştir. Metil paraben için 152,2 µg/L, Propil paraben için 18,0 µg/L ve Butil paraben için 19,4 µg/L dozlar kullanılmıştır (Khanna and Darbre 2013).

Metilparabenin *D. melanogaster*'de gelişim ve yumurta verimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada %2'lik metilparaben konsantrasyonunun toksik etki gösterdiği, yumurta, larva, pupa ve erginleşebilen birey sayılarını önemli oranda düşürdüğü belirlenirken aynı çalışmada metilparabenin %0,02'lik düşük

konsantrasyonunda bu sonuçların tersine östrojenik aktivite göstererek bu oranları artırdığı vurgulanmıştır (Wei 2009).

Parabenlerle ilgili yapılmış bir çalışmada insan meme tümörlerinde ölçülen parabenin esterlerinin, kozmetik, gıda ve farmakolojik ürünlerde bulunan paraben türevlerinin bir kısmının dokularda emildiğini ve parabenin metaboliti olan p-hidroksibenzoik asite hidroliz olmadığını göstermektedir. Dokularda metil, propil, bütül ve etil parabenin 12,7; 2,6; 2,3 ve 2,0 ng/g konsantrasyonlarının, izobutil parabenin ise 0,9 ng/g'lık konsantrasyonunun bulunduğu tespit edilmiştir. Parabenlerin östrojenik aktivitelerinin ise alkil zincir uzunluğuyla bağlantılı olduğu belirtilmiştir (Darbre ve ark. 2004).

Parabenlerin *Saccharomyces cerevisiae* ile yapılan bir çalışmada ise zayıf östrojenik reseptör aktivitesine sahip oldukları görülmüştür (Schultz ve ark. 2002).

Metil parabenin insanlarda deriye yüzeysel olarak uygulanmasıyla ilgili bir çalışmada, bu maddenin deri stratum korneum tabakasında yoğun miktarda biriktiğini göstermektedir (Ishiwatari ve ark. 2007).

Ayrıca başka bir çalışmada butil parabenin konsantrasyona da bağlı olarak insan sperm DNA'sında hasara yol açtığı da comet çalışmasıyla belirtilmiştir (Meeker ve ark. 2011).

İnsanlar çevresel faktörlerin de etkisiyle doğrudan ya da dolaylı olarak çeşitli kimyasalları vücutlarına almakta ve bu kimyasalların kanserojenik ve genotoksik risklerinin belirlenmesi insan sağlığı açısından büyük bir öneme sahip olmaktadır. Bunu belirlemek için ise kısa süreli, düşük maliyetli genotoksisite test sistemleri geliştirilmiştir. Bu test sistemleri sayesinde çeşitli kimyasalların insanlar üzerinde risk taşıma potansiyeline sahip olup olmadığı, zararlı etkilerinin ne boyutta olduğu incelenebilmektedir. Kısa zamanlı test sistemlerinden en yaygın olarak kullanılanlar; kardeş kromatid değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange = SCE) ve kromozom aberasyonu (KA) (Chromosomal Aberration = CA) testleridir.

Bu çalışmada, gıda ve kozmetik sektöründe antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılan: paraben ve türevleri; methylparaben, butylparaben,

ethylparaben, propylparaben, isobutylparaben, isopropylparaben günlük yaşamda birçok ürünün içeriğinde antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılan katkı maddelerinin, sağlıklı insan lenfositlerindeki genotoksik potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu maddelerin toksik ve bazı hücreler üzerindeki genotoksik etkileri ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmış olup, insan periferik lenfositleri üzerindeki genotoksik etkileri bilinmemektedir. İnsan lenfosit kültürü, *in vitro* test yöntemlerinde, güvenilirliği ve deney sonuçlarının insan sağlığı bakımından değerlendirilme olanağı nedeniyle sıklıkla kullanılan bir materyaldir (Mpountoukas ve ark. 2010).

Kullanılan katkı maddeleri her ne kadar yasal sınırlarda ürünler içinde bulunsun da, günlük yaşamda sadece tek bir üründe değil çok fazla sayı ve çeşitteki üründe bu kimyasallara insanların maruz kaldığı düşünülürse bu maddelerin genotoksik potansiyellerinin de olma ihtimali göz önüne alınmalıdır. Yapılmış olan bu tez çalışması sayesinde genotoksisite test yöntemlerinden elde edilen veriler ışığında, bu antimikrobiyal katkı maddelerinin insan sağlığı açısından zararının boyutu belirlenmeye çalışılmış olmaktadır. Bu sayede yaptığımız çalışmanın, genotoksik düzeyde lenfositlerle ilgili çalışma yapılmamış olduğu için, yürürlükteki kısıtlamalara da katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.



## 2. MATERYAL VE METOD

### 2.1. Materyal

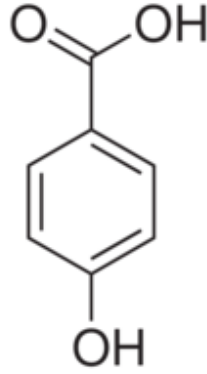
#### 2.1.1. Test maddeleri

Bu çalışmada antimikrobiyal katkı maddesi olarak kullanılan paraben ve türevleri olan metil, etil, propil, butil, izopropil ve izobutil parabenin periferik kan kültüründeki genotoksisitesini tespit etmek amacı ile kromozom aberasyonları (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve mikronukleus (MN) test yöntemleri kullanılmıştır. Uygulanan test yöntemleri ile CA, SCE ve MN sayıları saptanmış ve bölünme indekslerini tespit etmek için MI, RI ve CBPI oranları belirlenmiştir.

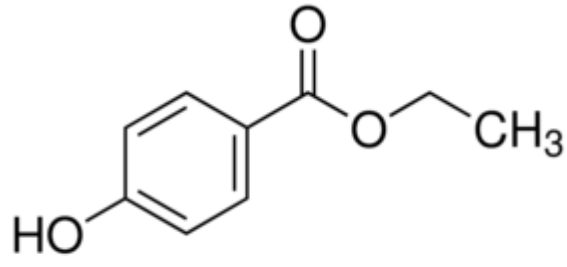
Pozitif kontrol olarak MMC 0,3 µg/ml lik konsantrasyonda uygulanmıştır. Elde edilen veriler ile istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

#### 2.1.2. Test maddelerinin genel kimyasal formülleri

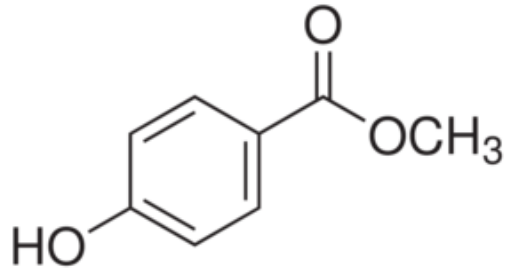
Deneyde kullandığımız test maddelerinin adları ve açık formülleri aşağıda verilmiştir (Şekil 2.1- 2.7).



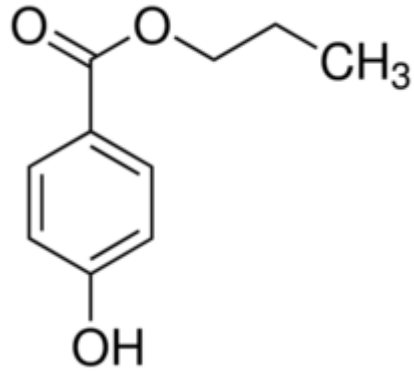
**Şekil 2.1.** Paraben (4-Hydroxybenzoic acid), Kapalı Formülü: C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, Moleküler ağırlık: 138,12 g/mol



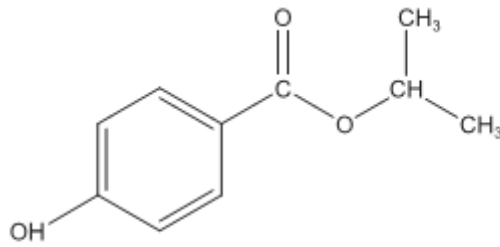
**Şekil 2.2.** Etil paraben (Ethyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü:  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{C}_2\text{H}_5$ , Moleküler ağırlık: 166,17 g/mol



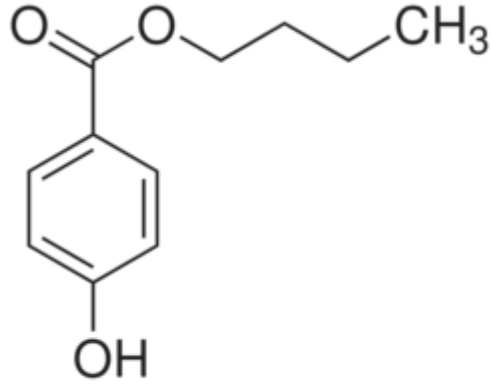
**Şekil 2.3.** Metil paraben (Methyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü:  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_3$ , Moleküler ağırlık: 152,15g/mol



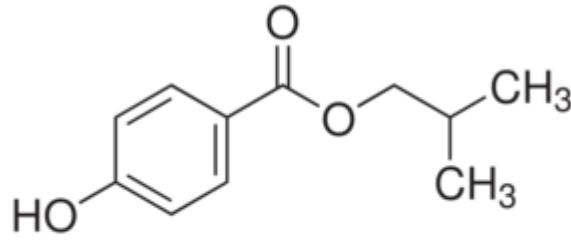
**Şekil 2.4.** Propil paraben (Propyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formülü:  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ ,  
Moleküler ağırlık: 180,20 g/mol



**Şekil 2.5.** İzopropil paraben (Isopropyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formül:  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_3$ , Moleküler  
ağırlık: 180,2 g/mol



**Şekil 2.6.** Bütül paraben (Butyl4-hydroxybenzoate), KapalıFormülü:  $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{CO}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , Moleküler ağırlık: 194,23 g/mol



**Şekil 2.7.** İzobütül paraben(Isobutyl 4-hydroxybenzoate), Kapalı Formül:  $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_3$ , Moleküler ağırlık: 194,23g/mol

### 2.1.3. Test maddelerinin dozları ve hazırlanışı

Test maddelerinin dozlarını belirlerken öncelikle CBPI üzerindeki etkisi incelenmiş ve sitotoksik doz bulunmaya çalışılmıştır. CBPI (sitokinezi bloklanmış proliferasyon indeksi) yeterli hücre proliferasyonu ve sitotoksiteyi göstermek için kullanılan bir indikatördür. CBPI'daki bir azalma hücre döngüsündeki bir

inhibisyonu ve hücrenin proliferasyon kapasitesindeki bir kaybı yansıtır. Bu testler bazı kimyasalların hücrelerdeki etki mekanizması hakkında önemli bilgiler de vermektedir.

Test maddelerinin sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini belirlemek için sitotoksik doz tayini çalışmaları yapılmıştır. Yapılan literatür taraması sonunda çalışacağımız test maddeleriyle ilgili insan lenfosit hücreleri üzerinde çalışma olmadığı için doz tayinini yaparken literatürdeki katkı maddeleriyle yapılmış çalışmalar ve farklı hücre tipleri üzerinde test maddeleriyle çalışılmış dozlar incelendi.

İlk uygulamalar için; 2000 µg/ml'den başlanarak 1000 ve 500 µg/ml'lik doz aralığında sitotoksikite araştırılmıştır. Test maddeleri çözücü olarak kullanılan DMSO içinde çözülerek steril koşullarda hazırlanmıştır. Pozitif kontrol (pozitif mutajen) olan MMC maddesi 0,3 µg/ml olacak şekilde deney öncesinde hazırlanmış, negatif kontrol olarak da DMSO deneysel süreçte kullanılmıştır. Spontan kontrol olarak kültüre edilecek lenfosit hücreleri kullanılmış ve deney sonuçları bu kontrol grubu değerleriyle karşılaştırılmıştır. Test maddelerinin her iki dozu da lenfosit hücre kültürüne 24 ve 48 saat olmak üzere farklı iki sürede uygulanmıştır. Deneyin 44. saatinde sitoplazma bölünmesini durdurmak amacıyla, sitokalasin-B (cyt-B) muamelesi yapılmıştır. Her bir uygulamada, hücreler test maddelerinin yanısıra, test maddelerinin çözücüsü olan DMSO ve genotoksik bir madde olan Mitomycin C ile ayrı ayrı kültüre edilerek kontrol değerleri elde edilmiş ve deney sonuçları, kontrol grubu değerleriyle karşılaştırılmıştır. Kültür süresi sonunda, lenfosit hücreleri izole edilerek, boyanıp, daimi preparat haline getirilmiş ve mikroskopik sayımlar gerçekleştirilmiştir. Sonuçta paraben türevlerinin sitotoksik olmayan 100 µg/ml, 50µg/ml, 25 µg/ml ve 10 µg/ml'lik dozları ile, parabenin 500 µg/ml, 250 µg/ml, 100 µg/ml ve 50 µg/ml' lik dozları sitotoksik olmayan, hücre proliferasyonu çok düşürmeyen ve çalışılacak uygun dozlar olarak belirlenmiştir.

#### **2.1.4. Kullanılan deney ekipmanları ve kimyasallar**

Santrifüj, mikroskop, inkübatör, pH metre, flow kabin, buzdolabı, hassas terazi, falcon tüp, mikropipet, enjektör, lam, lamel, erlen, beher, şale.

Kromozom medyumu, Sitokalsin B, MMC, kolşisin, Sorensen tamponu, fiksatif, Giemsa, hipotonik solüsyon, nitrik asit, entellan, BrdU.

### **2.2. Metod**

#### **2.2.1. CBMN metodu**

Fenech ve Morley tarafından, küf mantarlarının metabolitlerinden olan sitokalsin-B (Cyt-B) ile mitoz geçiren hücrelerde sitokinezi durdurma esasına dayanan ve bir hücre siklusunu tamamlayan hücrelerin binükleer görünümüyle ayırt edilmesine olanak sağlayan modifiye bir teknik geliştirilmiştir (Fenech ve Morley 1985). Mikronükleus sayısını saptamak için Fenech (2000) ve Kirsch-Volders ve ark. (2003) tarafından geliştirilen metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

##### **2.2.1.1. Lenfosit kültürü**

Sigara içmeyen, ilaç kullanmayan, 25 -30 yaşları arasında sağlıklı iki erkek bireyden steril koşullar altında alınan kan, 2,5 ml Kromozom Medyum-B bulunan tüplere, 6'şar damla (0,2 ml) olacak şekilde ilave edilmiş ve % 5'lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C de, toplam 72 saat inkübasyona alınmıştır. Bu inkübasyon süreci boyunca test maddelerinin hücrelere uygulanması sırasında herhangi bir kontaminasyona imkan vermemek için bu işlemler hücre kültürü laboratuvarında steril kabinde yapılmıştır.

##### **2.2.1.2. Test maddelerinin uygulanması**

İnsan periferik lenfositlerine, belirli dozlarda hazırlanmış olan paraben ve türevleri 24 ve 48 saatlik süreçlerde uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama için, kan ekimi yapıldıktan sonra kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik uygulama için kültür süresinin başlangıcından itibaren 24 saat sonra 2,5 ml Kromozom Medyum B içeren kültür ortamına test maddelerinin hazırlanmış olan dozları eklenmiştir. Maddelerin tüplere eklenmesinin ardından, tüpler tekrar inkübatöre konularak, toplam kültür süresi olan 72 saat bitimine kadar 37 °C'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde

bekletilmiştir. Kültür süresinin başlangıcından sonraki 44. saatte her tüpe sitokinezi engelleyici bir madde olan cyt-B (6 µg/ml) ilave edilmiş ve tüpler hafifçe sallanarak karışmaları sağlanmıştır.

### **2.2.1.3. Lenfositlerin izolasyonu**

72 saatlik kültür süresinin bitiminde, tüpler 1200 rpm' de 15 dakika santrifüj edilmiş, santrifüjden çıktıktan sonra tüplerdeki süpernatant kısımlar atılmıştır. Tüplerin dibinde kalan ve hücrelerin olduğu 0,7ml'lik sıvı iyice karıştırılarak hücrelerin homojen olarak dağılımları sağlanmıştır. Bu işlemin ardından deney günü 2 saat önceden hazırlanmış olan ve 37 °C sıcaklıktaki hipotonik solüsyon (% 0,4 KCl) damla damla ilave edildikten sonra tüpler oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Süre bitiminde 1200 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibindeki 0,7 ml'lik kısım pastör pipetiyle homojenize edildikten sonra, tüpler fiksasyon işlemi için hazır hale gelmiştir. Deneyden birkaç saat önce hazırlanarak buzdolabında bekletilen soğutulmuş metanol glasiyel asetik asit karışımı olan fiksatif damla damla ve karıştırılarak her tüpe 6 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Fiksatifin eklenmesi süresi de içinde olacak şekilde toplam 20 dakika tüpler oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 rpm'de tekrar santrifüj uygulamasına geçilmiştir. Santrifüj bitiminin ardından tüplerdeki süpernatant atıldıktan ve çökelti homojenize edildikten sonra tüplere aynı şekilde fiksatif ilavesi yapılmıştır. Bu fiksasyon işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Son fiksasyon işleminin ardından tüpteki sıvının berraklaştığı ve lenfosit hücrelerinin dipte beyaz bir şekilde toplandığı görülmüştür. Üstteki süpernatant kısım dipte 0,7 ml sıvı kalacak şekilde atılmış, dipteki hücrelerin olduğu sıvı karıştırılarak preparat yapma işlemine hazır hale getirilmiştir.

### **2.2.1.4. Preparatların hazırlanması**

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipetiyle homojen olacak şekilde karıştırılmıştır 0,7 ml'lik sıvının bir kısmı pasteur pipetiyle hassas bir şekilde çekilip önceden hazırlanmış özel bir düzeneğe tutturularak deney gününden önce temizlenip, saf su içinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine her lamın farklı alanlarına 6 damla gelecek şekilde 20 cm yükseklikten

damlatılarak preparasyon tamamlanmıştır. Her doz için 3 etiketli lam hazırlanmış ve preparatlar 24 saat oda sıcaklığında üzeri kapalı olarak kurumaya bırakılmıştır. Preparasyonda kullanılan lamlar 2 gün önce 1N HNO<sub>3</sub> ile 24 saat muamele edilmiş, ardından 30 dk musluk suyu altında yıkanarak 3 kez distile sudan geçirilerek +4 °C de kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir.

#### **2.2.1.5. Preparatların boyanması**

Lamlar, hazırlanmış olan % 5'lik Giemsa boyasında 12 dakika bekletilerek boyanmıştır.

**% 5'lik Giemsa'nın hazırlanması:** 5 ml tampon A, 5 ml tampon B ve 5 ml Giemsa karıştırılarak üzerleri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanmıştır (pH=6,8). Sonra bu boya eriyiği filtre kağıdı ile dik bir şaleye süzülmüştür. Hazırlanmış olan preparatlar şalelerdeki boyaların içerisine konularak boyanmaları sağlanmıştır. 12 dakikalık boyama süresinin bitiminde preparatlar boyadan çıkarılıp içerisinde distile su bulunan 3 ayrı beherden geçirilerek fazla boyanın lamlardan akması sağlanmış, preparatlar dik bir şekilde yerleştirilerek kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan preparatlar entellan ile kapatılarak daimi hale getirilmiştir. Entellan kuruduktan sonra (en az iki gün) bu daimi preparatlarda mikroskopik incelemeler yapılmıştır.

#### **2.2.1.6. Mikroskopik inceleme**

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda 40'lık objektif ile incelenmiştir (10x40=400 büyütmede). Bu incelemeler sırasında her bir kişiden hazırlanan preparatlardan 1000 iki nukleuslu (binükleer) hücre sayılmış, bu iki nukleuslu hücreler içerisinde mikronukleuslu olanlar saptanmıştır.

#### **2.2.1.7. CBPI' nin (hücre proliferasyon indeksi) saptanması**

CBPI hesaplanmasında bir, iki, üç ve dört nukleuslu hücreler tespit edilmektedir. CBMN tekniğine göre hazırlanan hücre kültürlerinde lenfosit hücresi sitokinez önlenerek bölündüğünden dolayı oluşan iki yeni nukleus aynı sitoplazma içinde kalacaktır.



CPBI'nın hesaplanması kimyasal veya fiziksel bir maddenin sitotoksik etkisini göstermede önemli bilgiler sağlar. CBPI ortalama değerleri hücre siklusu kinetiğinin ölçülmesini sağlamakta ve bu ölçümler belli kimyasal veya fiziksel ajanların sitotoksik etkileri hakkında önemli verileri yansıtmaktadır.

Her bir test maddesi için hazırlanan preparatlardan genellikle 1000 hücre sayılarak, bu hücreler arasından mononükleat (bir nükleuslu), binükleat (iki nükleuslu), trinükleat (üç nükleuslu) ve tetranükleat (dört nükleuslu) olanların oranı saptanır. Bu orandan yola çıkarak aşağıdaki formüle göre CPBI hesaplanır.

$$CPBI=1 \times MI + 2 \times MII + 3 \times (MIII+MIV)/N$$

(MI: Bir nükleuslu hücreler, MII: İki nükleuslu hücreler, MIII: Üç nükleuslu hücreler, MIV: Dört nükleuslu hücreler ve N: Toplam hücre sayısı=1000) (Surreales 1995).

CBPI sonuçlarına göre, kontrol gruplarında bölünen hücrelerin oranı ile test maddelerinin dozlarının uygulandığı hücrelerdeki CBPI oranları karşılaştırılmıştır. CBPI 'yı yüksek oranda düşüren dozlar için LD<sub>50</sub> değeri bulunurken; CBPI için bu değer altındaki dozlar için toksik nitelemesi yapılmıştır.

Parabenin türevlerinde, 1000 ve 500 µg/ml'lik dozlarda hücrelerin stoplazmalarının parçalandığı, çekirdeklerinin hasar gördüğü ve stoplazmalı düzgün lenfosit hücre sayısı elde edilemediği için bu dozlar LD<sub>50</sub> değerinin de altında olan toksik dozlar olarak tespit edildi. Bu nedenle bu dozlar CBPI hesaplamasında kullanılmadı. Çünkü hücre proliferasyonunu hesaplayabilmemiz için hücre bölünmesini geçirmiş olan iki çekirdekli ve çoklu çekirdekli hücrelere gerek duyulmaktadır. Test maddelerinin 250 ve 125 µg/ml'lik dozları için CBPI hesaplandığında spontan kontrole göre CBPI değerlerinde azalma olduğu tespit edildi. Bu dozlar, parabenin türevlerinde LD<sub>50</sub> değeri olarak belirlendi.

## **2.2.2. SCE ve CA metodu**

### **2.2.2.1. Lenfosit kültürü**

Sigara içmeyen, ilaç kullanmayan, 25 -30 yaşları arasında sağlıklı iki vericiden steril koşullar altında alınan kan, 2,5 ml Kromozom Medyum-B bulunan tüplere, 6'şar damla (0,2 ml) olacak şekilde ilave edilmiştir. Kan hücrelerinin

tüplere eklenmesinin hemen ardından karanlık ortamda saklanan BrdU solüsyonu her tüpe 10 µg/ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Tüpler %5' lik CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37 °C de, toplam 72 saat inkübasyona alınmıştır. Bu inkübasyon süreci boyunca test maddelerinin hücrelere uygulanması sırasında herhangi bir kontaminasyona imkan vermemek için bu işlemler hücre kültürü laboratuvarında steril kabinde yapılmıştır.

#### **2.2.2.2. Test maddelerinin uygulanması**

İnsan periferel lenfositlerine, belirli dozlarda hazırlanmış olan paraben ve türevleri 24 ve 48 saatlik süreçlerde uygulanmıştır. 24 saatlik uygulama için, kan ekimi yapıldıktan sonra kültür süresinin 48. saatinde, 48 saatlik uygulama için kültür süresinin başlangıcından itibaren 24 saat sonra 2,5 ml Kromozom Medyum B içeren kültür ortamına test maddelerinin hazırlanmış olan dozları eklenmiştir. Maddelerin tüplere eklenmesinin ardından, tüpler tekrar inkübatöre konularak, toplam kültür süresi olan 72 saat bitimine kadar 37 °C'lik CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletilmiştir. Ayrıca 24 ve 48 saatlik muamele sürelerinde pozitif kontrol olarak MMC kullanılmıştır. MMC tüplere 0,3 µg/ml olacak şekilde verilmiştir.

#### **2.2.2.3. Lenfositlerin izolasyonu**

Kültür süresinin bitiminden 2 saat önce (yani kültürün 70. saatinde) her tüpe hazırlanan kolşisin eriyiğinden ilave edilmiş (0,06 µg/ml) ve tüpler hafifçe sallanarak iyice karıştırılmıştır. Hücreler 2 saat süresince (37 °C'de) kolşisin ile ön muameleye tabi tutulmuştur .

Ön muamelenin ardından 72. saatte tüpler 1750 rpm'de 5dk santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Dipte kalan 1ml'lik sıvı homojenize edilmişve önceden hazırlanarak 37 °C'lik etüvde bekletilen hipotonik solüsyon (KCl % 0,4'lük) damla damla 7 ml ilave edildikten sonra tüpler 37 °C'lik etüvde yarım saat bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 1200 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Deneyden birkaç saat önce hazırlanarak buzdolabında bekletilen soğutulmuş metanol glasiyel asetik asit karışımı olan fiksatif damla damla ve karıştırılarak her tüpe 6 ml olacak şekilde ilave edilmiştir. Fiksatifin eklenmesi süresi de içinde olacak şekilde toplam 20 dakika

tüpler oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 1200 rpm’de tekrar santrifüj uygulamasına geçilmiştir. Santrifüj bitiminin ardından tüplerdeki süpernatant atıldıktan ve çökelti homojenize edildikten sonra tüplere aynı şekilde fiksatif ilavesi yapılmıştır. Bu fiksasyon işlemi 3 defa tekrarlanmıştır. Son fiksasyon işleminin ardından tüpteki sıvının berraklaştığı ve lenfosit hücrelerinin dipte beyaz bir şekilde toplandığı görülmüştür. Üstteki süpernatant kısım dipte 0,7 ml sıvı kalacak şekilde atılmış, dipteki hücrelerin olduğu sıvı karıştırılarak preparat yapma işlemine hazır hale getirilmiştir.

#### **2.2.2.4. Preparatların hazırlanması**

Tüpün dibinde toplanan hücreler pastör pipetiyle homojen olacak şekilde karıştırılmıştır 0,7 ml’lik sıvının bir kısmı pasteur pipetiyle hassas bir şekilde çekilip önceden hazırlanmış özel bir düzeneğe tutturularak deney gününden önce temizlenip, saf su içinde buzdolabında saklanan lamaların üzerine her lamın farklı alanlarına 6 damla gelecek şekilde 60 cm yükseklikten damlatılarak preparasyon tamamlanmıştır. Her doz için 3 etiketli lam hazırlanmış ve preparatlar 24 saat oda sıcaklığında üzeri kapalı olarak kurumaya bırakılmıştır. Preparasyonda kullanılan lamalar 2 gün önce 1N HNO<sub>3</sub> ile 24 saat muamele edilmiş, ardından 30 dk musluk suyu altında yıkanarak 3 kez distile sudan geçirilerek +4 °C’de kapalı bir şekilde muhafaza edilmiştir.

#### **2.2.2.5. Preparatların boyanması**

Kuruyan preparatlardan CA ve SCE için ayrı ayrı etiketlenmiş olan preparatların boyama işlemleri ayrı ayrı yapılmıştır.

CA denemesi için boyama işlemi hazırlanmış olan % 5’lik Giemsa ile 26 dk boyunca uygulandıktan sonra her preparat 3 ayrı beherde bulunan distile sudan geçirilip fazla boyanın lamlardan akması sağlanmış ve preparatlar dik bir şekilde kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan lamalar daha sonra entellan ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye hazır hale getirilerek sayımlara başlanmıştır.

SCE denemesinde ise önce preparatlar ışınlanmış ardından boyanmıştır. Bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla Speit ve Haupter (1985)’in geliştirdikleri metod modifiye edilerek kullanılmıştır.

Bu amaçla bir günlük preparatlar ışınlama kabına konarak üzeri bir film gibi örtünecek şekilde Sorensen tamponu denilen ışınlama eriyiği ile kapatılmıştır. Işınlama eriyiği, 5 ml tampon A, 5 ml tampon B'den alınıp bu karışımın destile su ile 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmıştır (pH=6,8). Işınlama eriyiğinin fazla veya az olması kardeşromatidler arasındaki kontrast farkını önemli derecede etkilediği için ince bir tabaka halinde ışınlama eriyiği ile örtülen preparatlar, karanlıkta 15 cm yükseklikten 30 W'lık 254 nm dalga boyunda ışık yayabilen ultraviyole lambası ile 30 dk ışınlanmıştır.

**Sorensen tamponunun hazırlanması:** Bu tampon eriyik tampon A ve tampon B olmak üzere iki stok çözelti halinde hazırlanmış olup bu çözeltiler çalışmanın amacına uygun olarak birbirleriyle değişik miktarlarda karıştırılarak kullanılmıştır.

**Hazırlanışı:**

**Tampon A:** 11,34 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=4,8).

**Tampon B:** 14,83 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  250 ml saf su içinde eritilmiştir (pH=9,3).

Işınlamanın ardından lamalar 58-60 °C sıcaklıkta 1xSSC solüsyonu ile 45-60 dk muamele edilmiştir.

**Standart saline citrate (SSC) eriyiğinin hazırlanması:** Bu eriyik ışınlamadan sonra kardeş kromatidler arasındaki kontrast farkını artırmak amacıyla kullanılmıştır. SSC eriyiğini hazırlamak için 11,05 g trisodyumsitrat ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve 21,9 g NaCl kullanılmıştır. Bu iki madde ayrı ayrı kaplarda bir miktar saf su içerisinde çözülmüş, daha sonra aynı kaba aktararak birbirleriyle karıştırılmış ve üzerlerine 500 ml oluncaya kadar saf su ilave edilmiştir. Hazırlanan bu stok eriyik 5xSSC'dir ve bu eriyik buzdolabında saklanmıştır. Deneyde, bu stoktan 20 ml alıp üzeri 100 ml oluncaya kadar saf su ile tamamlanarak elde edilen 1xSSC kullanılmıştır.

1xSSC ile muamale edilen preparatlar bu bekleme süresi sırasında hazırlanan ve süzölmüş olan giemsa boyası ile 26 dk boyunca boyandıktan

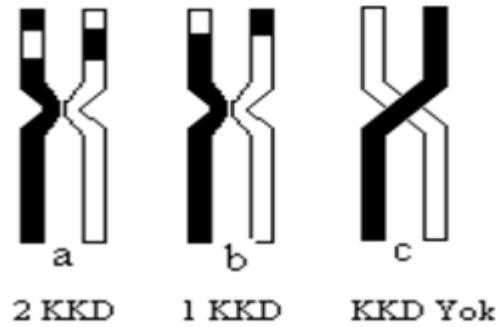
sonra distile su dolu beherlerden geçirilmiş ve lam kurutma aparatına alınarak 1 gün kuruması beklenmiş, entellan ile kaplanarak daimi hale getirilmiştir.

#### 2.2.2.6. Mikroskopik inceleme

Hazırlanmış olan daimi preparatlar Olympus marka binoküler ışık mikroskopunda 100'lük objektif ile incelenmiştir (10x100=1000 büyütmede).

#### 2.2.2.7. SCE sayısının saptanması

SCE sayısı, her kişinin kan kültürüne ait preparatlardan iyi dağılmış ve ikinci mitozu geçiren 25 hücrede (2 kişiden toplam 50 hücrede) belirlenmiş, hücre başına düşen ortalama SCE sayısı (SCE/hücre) hesaplanmıştır. SCE sayısı bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla belirlenmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990). Ortadan bir parça değişimi olmuş ise bu iki SCE olarak (Şekil 2.7.a), uçtan parça değişimi olmuş ise bu da bir SCE olarak değerlendirilmiştir (Şekil 2.7.b). Ancak bu incelemeler esnasında kromatidlerin primer boğum bölgelerinden dönüm yapıp yapmadıklarına dikkat etmek gerekir. Bu durumdaki kromozomlarda SCE yoktur (Şekil 2.7.c). Her kişinin 25 ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerinde SCE sayısı belirlenmiş bundan her kişi için hücre başına düşen ortalama SCE sayısı (SCE/hücre) hesaplanmıştır.



**Şekil 2.8.** Kardeş kromatid değişiminin olduğu ve olmadığı durumun şematik olarak gösterilmesi (Topaktaş ve Speit, 1990)

### 2.2.2.8. Replikasyon indeksi (RI) saptanması

DNA replikasyonu üzerinde incelenen test maddelerinin etkilerini saptamak için Replikasyon indeksi (RI) belirlenmiştir. Bunun için tesadüfi seçilmiş olan 100 hücre incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında gözlenen birinci, ikinci ve üçüncü metafaz devresindeki hücreler sayılmıştır.

Bu verilerden yola çıkarak RI şu şekilde hesaplanmıştır:

$$RI = (1 \times M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3) / 100$$

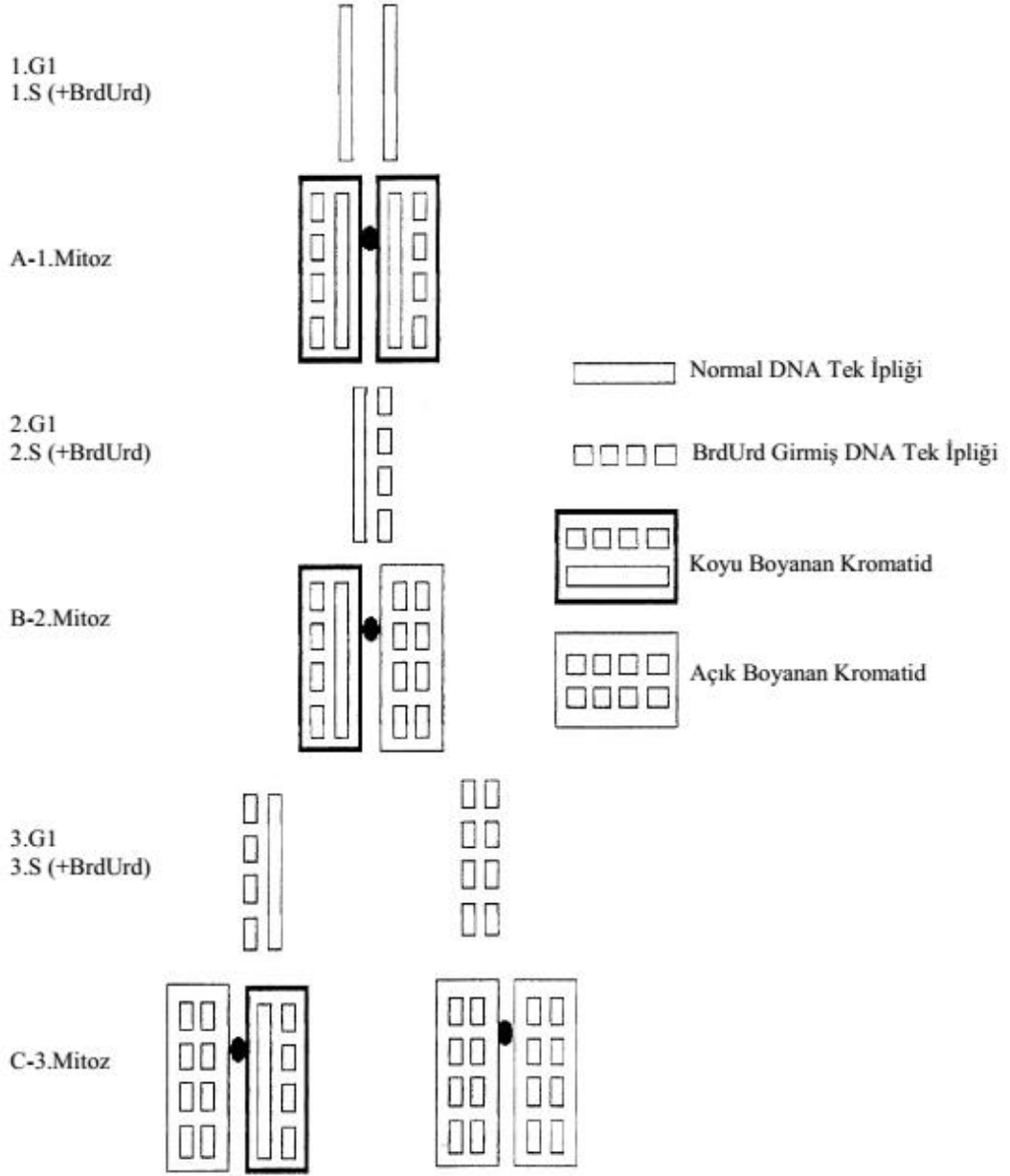
M1: 1. Mitozdaki hücre sayısı

M2: 2. Mitozdaki hücre sayısı

M3: 3. Mitozdaki hücre sayısı

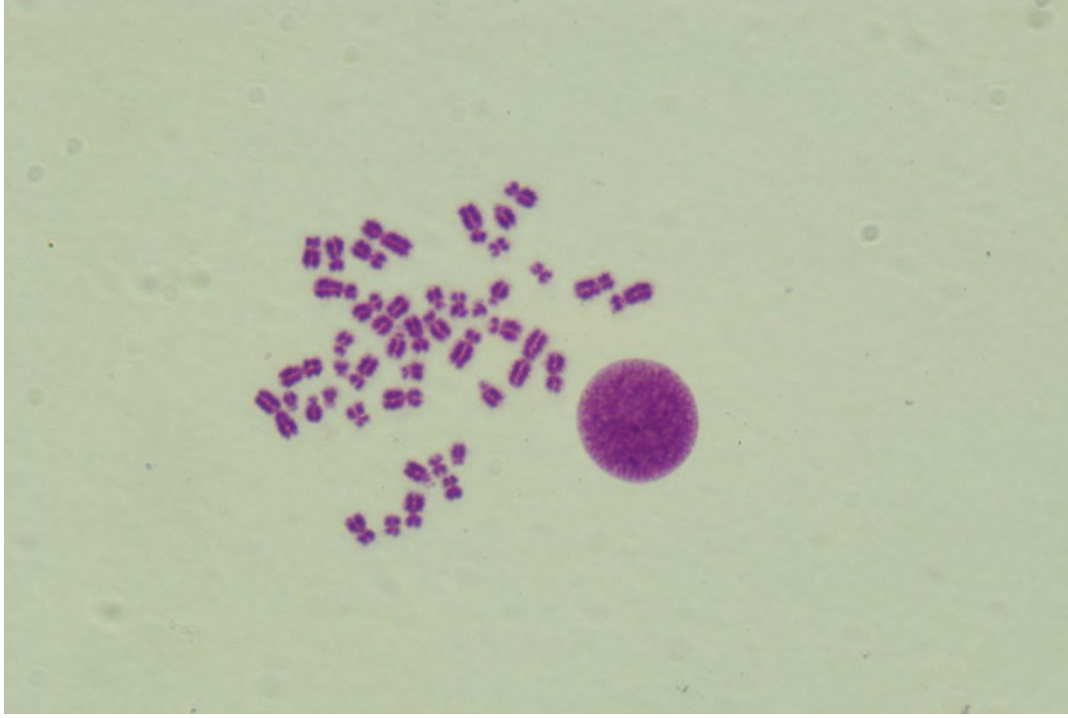
Birinci, ikinci ve üçüncü metafazlar şu şekilde ayırt edilmiştir (Topaktaş ve Speit, 1990): Bromodeoksiuridin (BrdU), DNA'nın yapısında bulunan deoksitimin (dT) bazının analogu olduğu için, kültür tüplerine BrdU konulduğunda hücre DNA'sını replike ettiği sırada (1.S fazında) yeni sentezlenen polinükleotid ipliğinde dT'nin yerini ortamda bulunan BrdU alacaktır. Böyle hücrelerin kromozomları boyandığında bir kromozomun her iki kromatidi de (dT /Br dU: dT/BrdU) homojen koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler 1. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerden meydana gelen yavru hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda 2.S fazı) dT ihtiva eden polinükleotid ipliğine komplementer olarak sentezlenen yeni DNA ipliğinde BrdU yer alacaktır. Bu iki polinükleotid ipliği bir kromozomun koyu boyanan kromatidini (dT/BrdU) oluşturacaktır. BrdU'lu ipliğe komplementer olarak sentezlenen yeni ipliğe de BrdU girecektir ve bir kromatidi oluşturan iki polinükleotid ipliği de BrdU ihtiva ettiğinden (BrdU/BrdU) bu kromatid aynı kromozomun açık boyanan kromatidini oluşturacaktır. İşte bu hücrenin metafaz devresinde preparat yapıldığında, hücrenin tüm kromozomlarının kromatidlerinden biri koyu diğeri ise açık boyanacaktır. Bunlar da ikinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Bu hücreler tekrar S fazına girdiğinde (BrdU'lu ortamda 3.S fazı) 2. mitozda açık boyanan kromatid'ten tüm polinükleotid ipliklerine BrdU girmiş olan bir kromozom

meydana gelecektir ve bu kromozomun her iki kromatidi de açık renkte boyanacaktır. İkinci mitozda koyu boyanan kromatid'ten ise, bir kromatidin her iki ipliği BrdU'lu ve diğer kromatidin bir ipliği BrdU'lu diğer ipliği timinli olan bir kromozom oluşacaktır. Bu kromozom boyandığında da bir kromatidi açık renkte bir kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. İşte böyle hücrelerin metafaz devresinde preparat yapıldığında bazı kromozomların her iki kromatidi açık renkte, bazı kromozomların bir kromatidi açık diğer kromatidi de koyu renkte boyanacaktır. Bu hücreler de 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerdir. Bu şekilde 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücreler ayırt edilmiş, bu hücrelerin 100 hücre içindeki sayısı saptanmış, bundan da yukarıda belirtilen formüle göre RI hesaplanmıştır.

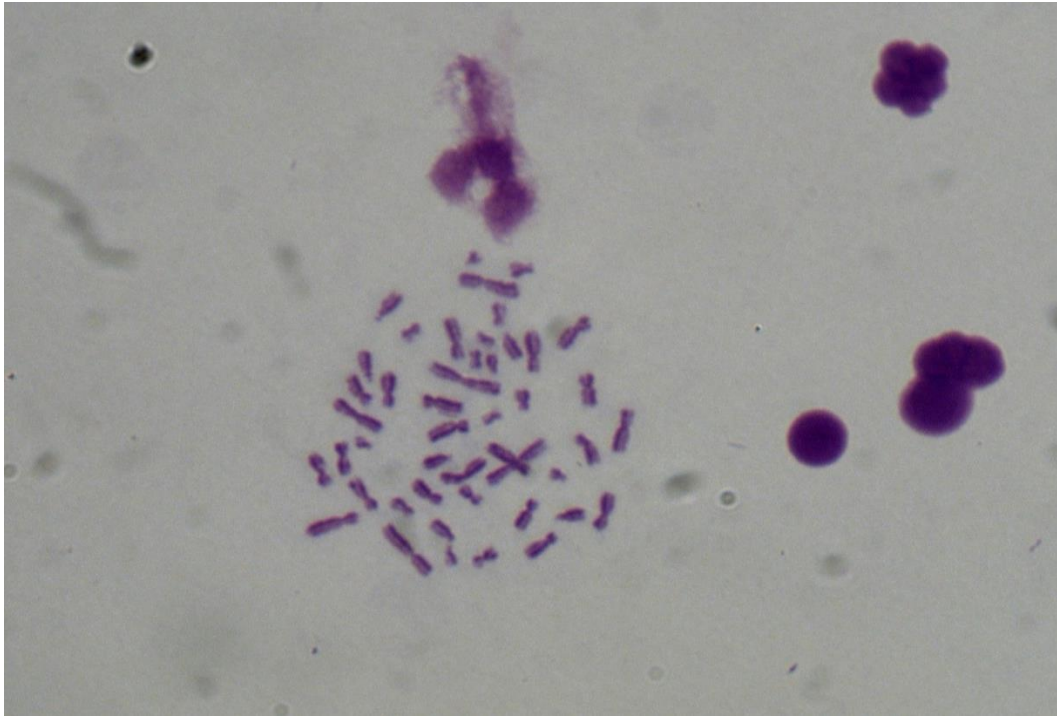


**Şekil 2.9.** BrdUrd'in DNA yapısına girmesi ile 1., 2. ve 3. mitoz bölünmeyi geçiren hücrelerin ayırt edilmesinin şematik olarak açıklanması (During 1985'e göre Topaktaş ve Speit 1990'den)

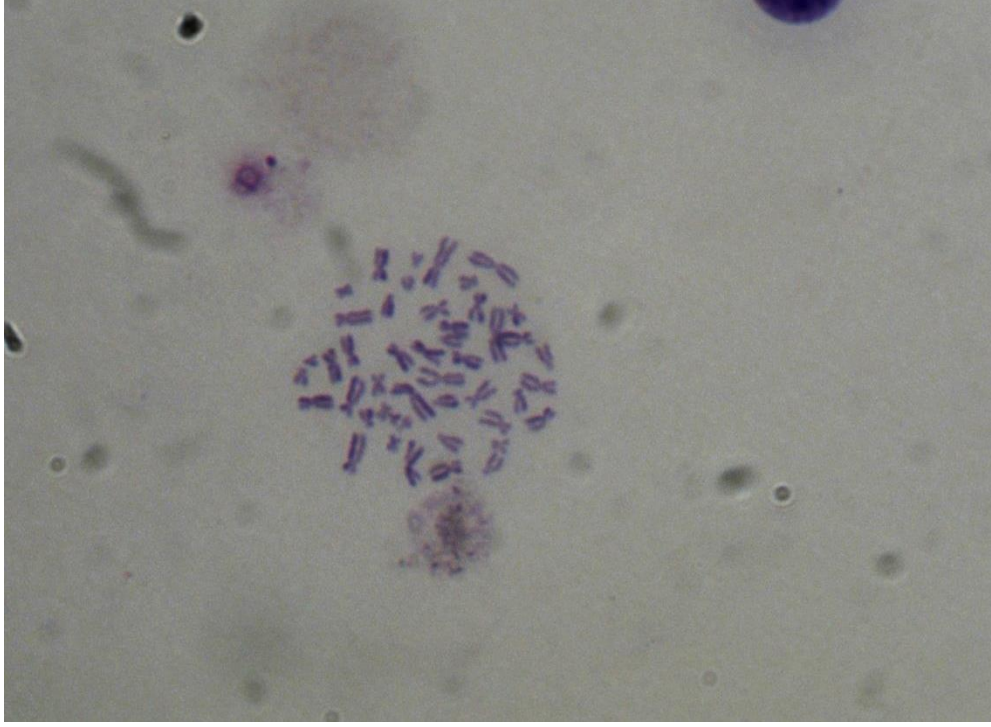




Şekil 2.10. Birinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000)



Şekil 2.11. İkinci mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000)



**Şekil 2.12.** Üçüncü mitoz bölünmeyi geçiren hücrenin metafaz kromozomları (X1000)

#### **2.2.2.9. Kromozom anormalliklerinin (CA) saptanması**

Test maddelerinin kromozom aberasyonu üzerine etkisini incelemek için, her bir kişiden hazırlanan preparatlardan iyi dağılmış kromozomlara sahip toplam 100 hücre (2 kişiden toplam 200 hücre) CA'yı saptamak amacıyla incelenmiştir. Bu hücreler içinde gözlediğimiz kromozom yapı ve sayı anormallikleri Uluslararası İnsan Sitogenetik Adlandırma Sistemine (ISCN= International System for Human Cytogenetic Nomenclature) uygun olarak değerlendirilmiş ve adlandırılmıştır (Paz-y-Mino ve ark. 2002). İncelenen bu 100 hücre içinde toplam aberasyonların sayılıp incelenen hücre sayısına bölünmesiyle hücre başına düşen CA sayısı (CA/hücre) saptanmıştır. Bu çalışmada sayısal kromozom anormallikleri oluşmadığı için değerlendirilmemiştir. Kromozom tipi anormallikler olarak kromozom kırığı, kromatid kırığı, sister union, disentrik kromozom ve ring oluşumları değerlendirilmiştir.

#### **2.2.2.10. Mitotik indeksin (MI) saptanması**

Mitotik indeks (MI), hücre siklusunda metafazdaki hücre yüzdesini verir. Azalmış MI, hücre siklusu ilerlemesinde inhibisyonu ve/veya proliferatif kapasitedeki kaybı gösterir.

Test maddelerinin mitoz bölünme üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla MI değerleri saptanmıştır. MI'yi saptamak amacıyla her vericiye ait preparatların her birinden 1000'er hücre, toplamda 2000 hücre incelenmiş ve bunlar arasında mitoz bölünme geçiren hücrelerin sayısı kaydedilmiştir. 2 bin hücre içinde mitoz geçiren hücrelerin oranı yüzde cinsinden hesaplanarak MI saptanmıştır.

#### **2.2.2.11. İstatistiksel analiz**

Mikroskobik inceleme sonucunda muameleli gruplardan elde edilen SCE, CA, MN, CBPI, RI ve MI değerleri ile kontrol, çözücü ve pozitif kontrollerin değerleri arasındaki farkın önemli olup olmadığı SPSS 21 programında One Way Anova'da Dunnet-t testi kullanılarak istatistiksel açıdan anlamlılıkları belirlenmiştir. Ayrıca mikroskobik incelemelerden elde edilen sonuçlar çizelge ve grafikler halinde verilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirmelerde anlamlılık değeri olarak  $P \leq 0,05$ ; 0,01; 0,001 kullanılmıştır.

### **3. BULGULAR**

#### **3.1. Paraben ve Türevlerinin Mikronukleus Oluşumu ve Hücre Proliferasyonu Üzerine Etkileri**

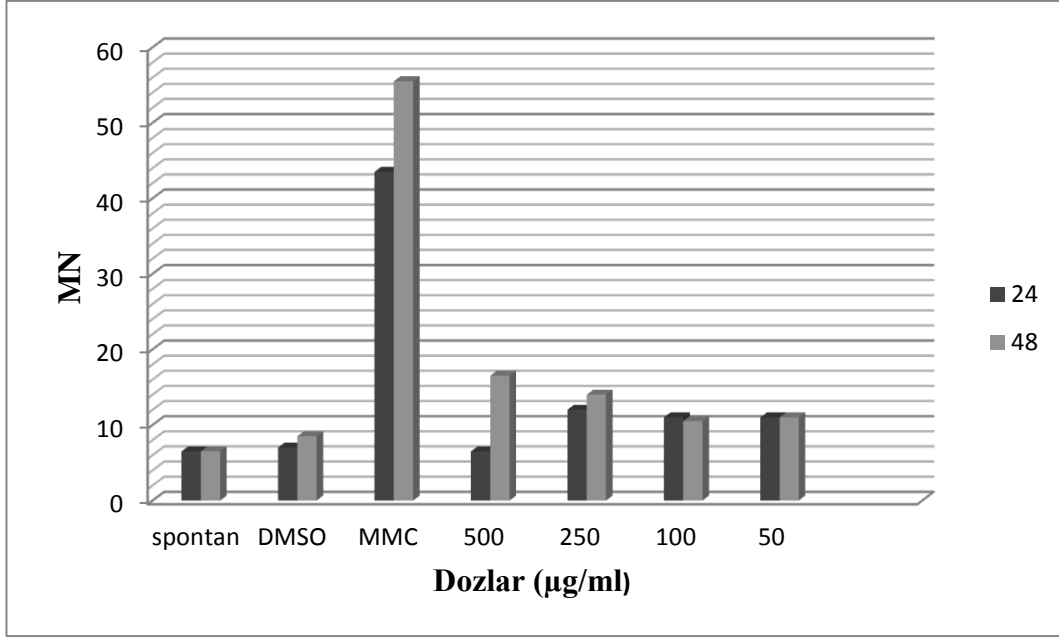
CBMN test yönteminde spontan olarak ya da genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da tüm kromozomların hücre bölünmesi sırasında, ana çekirdek dışında yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşan mikronükleuslar binükleat hücrelerdeki sayılarına göre belirlenmiştir. Mikronukleus sayısını belirlemek amacıyla her bir kişiye ait daimi preparatlarda her kişinin, her muamele grubu ve kontrollerinde iki nukleusa sahip (binükleat) toplam 1000 hücre incelenmiş ve bu binükleat hücreler içerisinde mikronükleuslu olanlar saptanmıştır. Ayrıca incelenen hücrelerde toplam mikronükleus sayısı belirlenmiştir. Her iki donörle yapılan deneylerden elde edilen veriler ışığında her bir doz ve madde için 1000 binükleat hücredeki MN sayısı spontan kontrolle karşılaştırılarak 24 ve 48 saatlik sürelerdeki MN anlamlılık değerleri standart sapmalara bağlı olarak çizelgeler halinde oluşturulmuştur (Çizelge 3.1-7). Deney sonucu elde edilen tekli, ikili, üçlü ve dörtlü çekirdeğe sahip hücreler ve mikronükleuslar fotoğraflanarak belirlenmiştir (Şekil 3.15- 18).

Hücreler için sitotoksik etkiyi incelemek adına sitokinezi bloke edilmiş hücre proliferasyon indeksi (CBPI) denilen ve hücrenin bölünme hızını ölçen bir değerlendirme yapılmıştır. Uygulanan kimyasalın toksisite derecesi ne kadar yüksek ise CBPI değeri o kadar düşük çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında incelediğimiz paraben ve türevlerinin meydana getirdiği MN sayıları ve CBPI değerleri kontrol gruplarından elde edilen veriler ışığında değerlendirilmiş, SPSS 21 programında One Way Anova'da Dunnet-t testi kullanılarak istatistiksel açıdan anlamlılıkları belirlenmiş, analiz sonuçlarına göre spontan kontrol, pozitif kontrol, çözücü kontrol ve kullanılan tüm dozların anlamlılık derecesi “\*” işareti ile ifade edilerek sonuçlar çizelgeler şeklinde oluşturulmuştur (Çizelge 3.1-7). Ayrıca test maddelerinin lenfosit hücreleri üzerinde MN ve CBPI değerlerine etkileri grafikler halinde verilmiştir (Şekil 3.1-14).

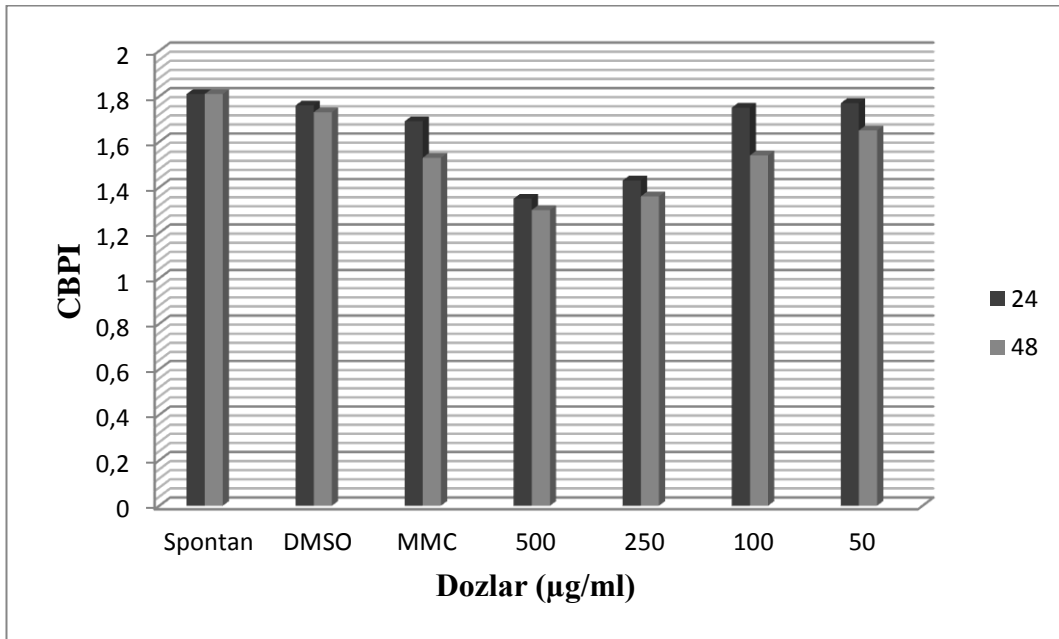
**Çizelge 3.1.** Parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz ( $\mu\text{g/ml}$ )	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı $\pm$ SD (toplam MN $\pm$ SD)	CBPI $\pm$ SD (hücre proliferasyon İndeksi $\pm$ SD )
Spontan	24	-	2000	6,50 $\pm$ 2,12	1,810 $\pm$ 0,042
DMSO		20 $\mu\text{l}$	2000	7,00 $\pm$ 0,00	1,765 $\pm$ 0,035
MMC		0,3	2000	43,5 $\pm$ 7,77***	1,690 $\pm$ 0,014
Paraben		50	2000	11,0 $\pm$ 2,82	1,773 $\pm$ 0,047
		100	2000	11,0 $\pm$ 4,24	1,755 $\pm$ 0,049
		250	2000	12,0 $\pm$ 1,41	1,432 $\pm$ 0,045***
		500	2000	6,50 $\pm$ 0,70	1,350 $\pm$ 0,014***
Spontan		48	-	2000	6,50 $\pm$ 2,12
DMSO	20 $\mu\text{l}$		2000	8,50 $\pm$ 0,70	1,737 $\pm$ 0,024
MMC	0,3		2000	55,5 $\pm$ 2,12***	1,530 $\pm$ 0,070**
Paraben	50		2000	11,0 $\pm$ 2,82	1,650 $\pm$ 0,028*
	100		2000	10,5 $\pm$ 0,70	1,540 $\pm$ 0,056**
	250		2000	14,0 $\pm$ 5,65	1,368 $\pm$ 0,040***
	500		2000	16,5 $\pm$ 0,70*	1,302 $\pm$ 0,031***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi  $\pm$  SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\*  $P \leq 0,05$ ; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.1. Parabenin MN sayısı üzerine etkisi

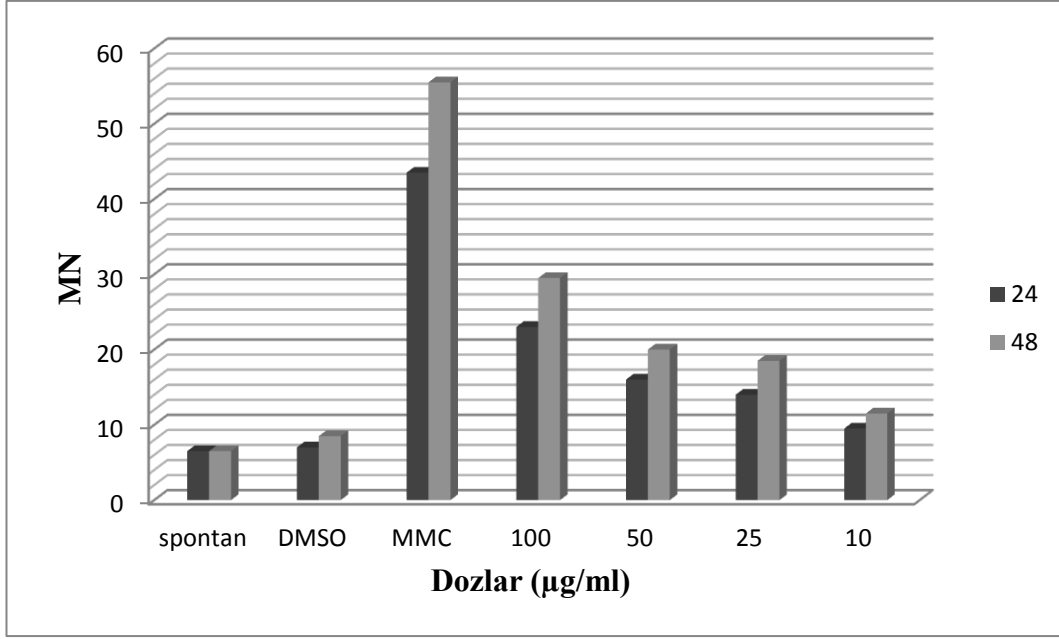


Şekil 3.2. Parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi

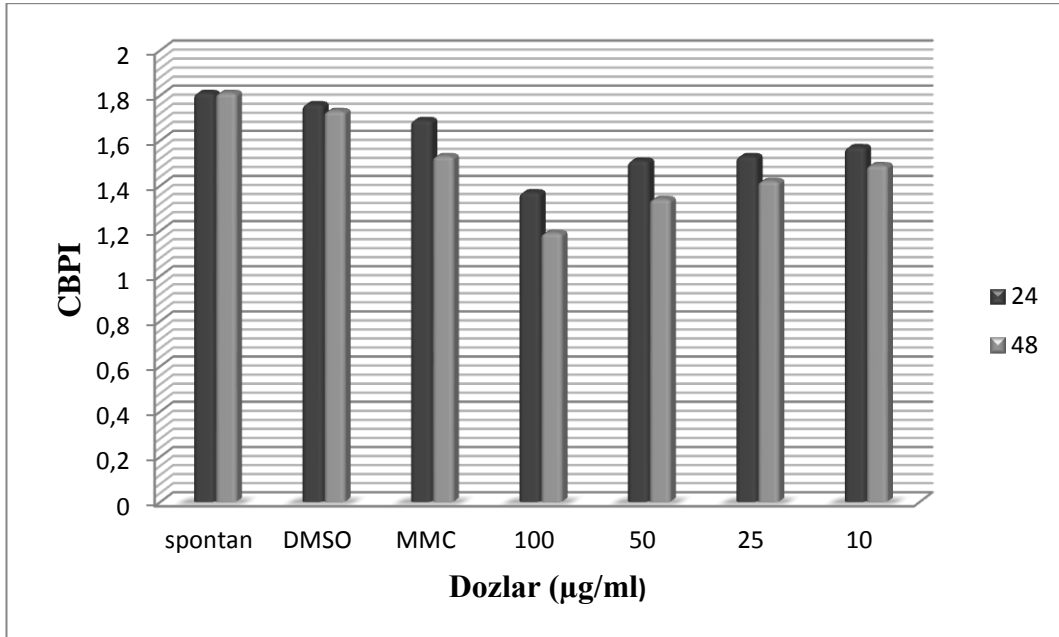
**Çizelge 3.2.** Metil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı±SD (toplam MN ±SD)	CBPI±SD (hücre proliferasyon İndeksi±SD )
Spontan	24	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	7,00±0,00	1,765±0,035
MMC		0,3	2000	43,5±7,77***	1,690±0,014
Metil paraben		10	2000	9,5±0,70	1,570±0,042**
		25	2000	14,0±2,82	1,539±0,029***
		50	2000	16,0±2,82	1,510±0,056***
		100	2000	23,0±4,24*	1,370±0,028***
Spontan	48	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	8,50±0,70	1,737±0,024
MMC		0,3	2000	55,5±2,12***	1,530±0,070**
Metil paraben		10	2000	11,5±6,36	1,492±0,060**
		25	2000	18,5±0,70*	1,424±0,007***
		50	2000	20,0±5,65*	1,347±0,095***
		100	2000	29,5±3,53**	1,191±0,015***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.3. Metil parabenin MN sayısı üzerine etkisi



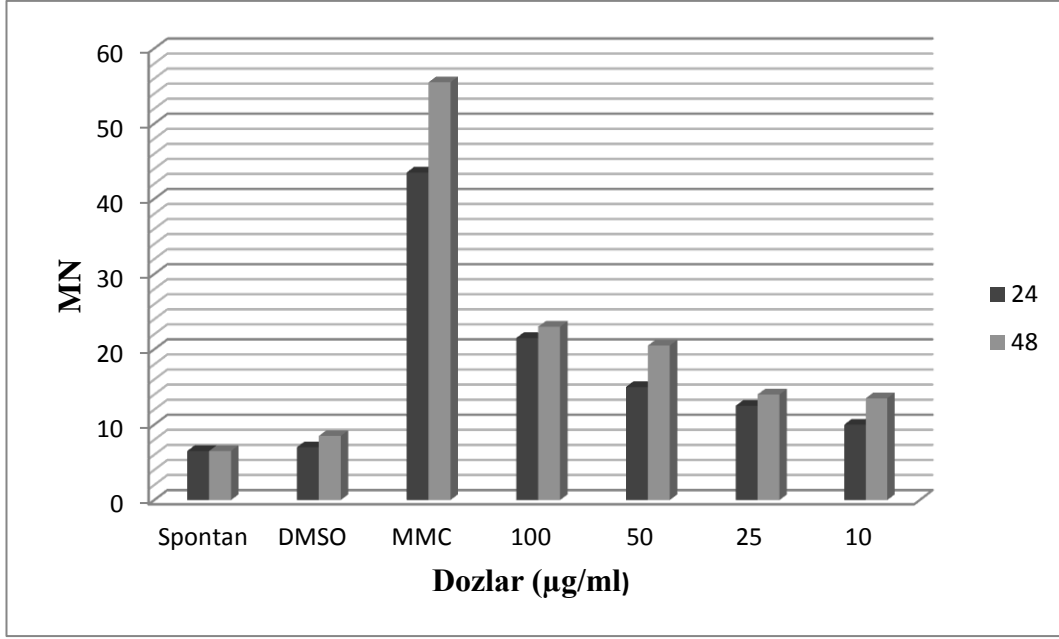
Şekil 3.4. Metil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi



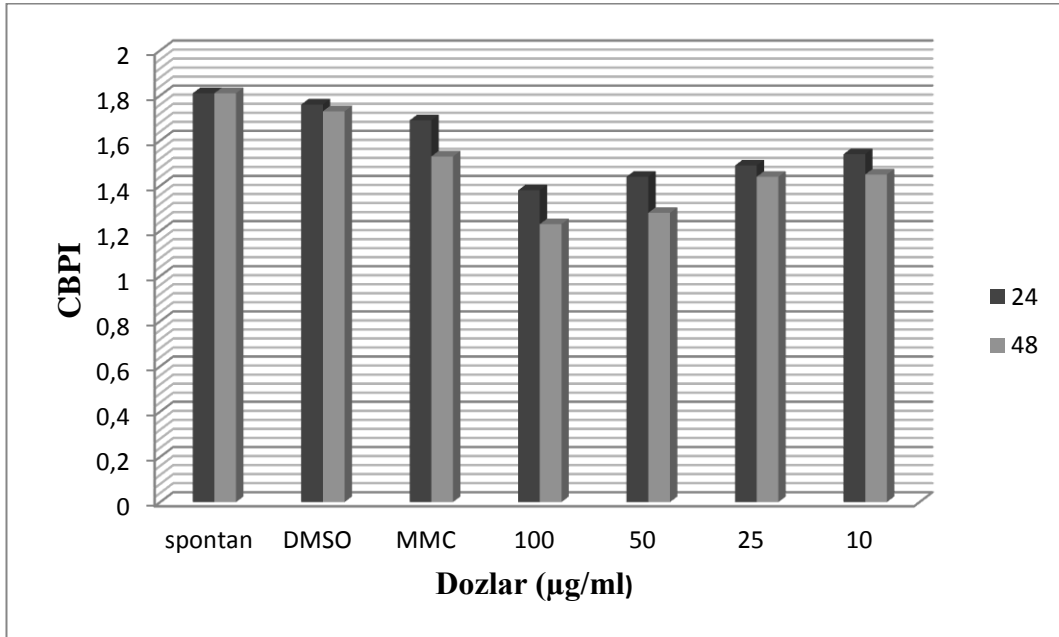
**Çizelge 3.3.** Etil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı±SD (toplam MN±SD)	CBPI±SD (hücre proliferasyon İndeksi±SD )
Spontan	24	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	7,00±0,00	1,765±0,035
MMC		0,3	2000	43,5±7,77***	1,690±0,014
Etil paraben		10	2000	10,0±1,41	1,542±0,010***
		25	2000	12,5±3,53	1,491±0,034***
		50	2000	15,0±2,82	1,442±0,053***
		100	2000	21,5±4,94*	1,385±0,050***
Spontan	48	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	8,50±0,70	1,737±0,024
MMC		0,3	2000	55,5±2,12***	1,530±0,070**
Etil paraben		10	2000	13,5±0,70	1,455±0,063***
		25	2000	14,0±2,82	1,449±0,043***
		50	2000	20,5±4,94**	1,281±0,029***
		100	2000	23,0±1,41***	1,231±0,030***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.5. Etil parabenin MN sayısı üzerine etkisi

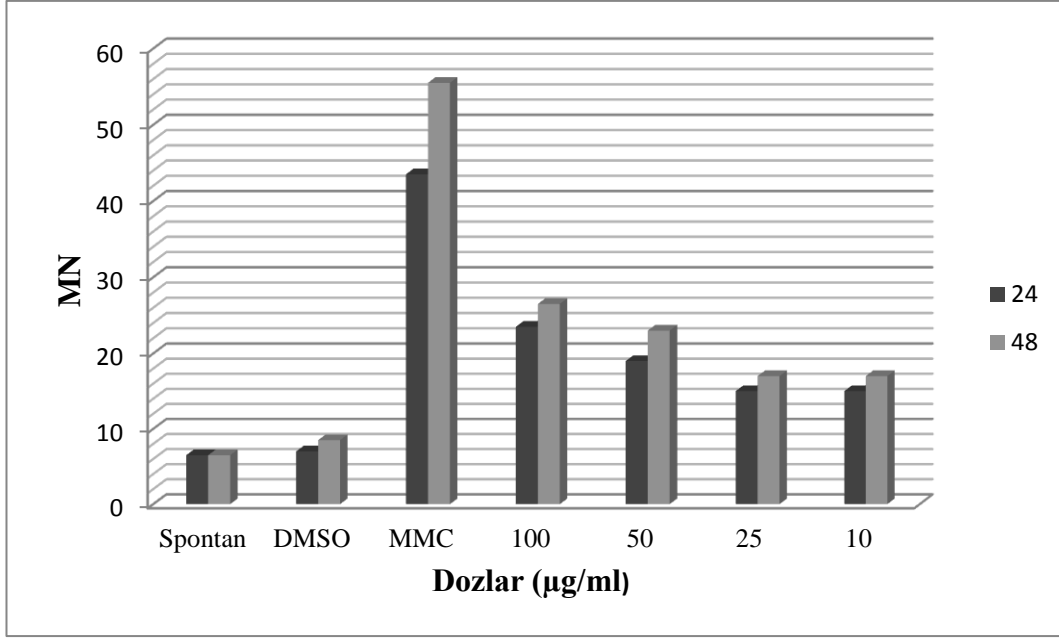


Şekil 3.6. Etil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi

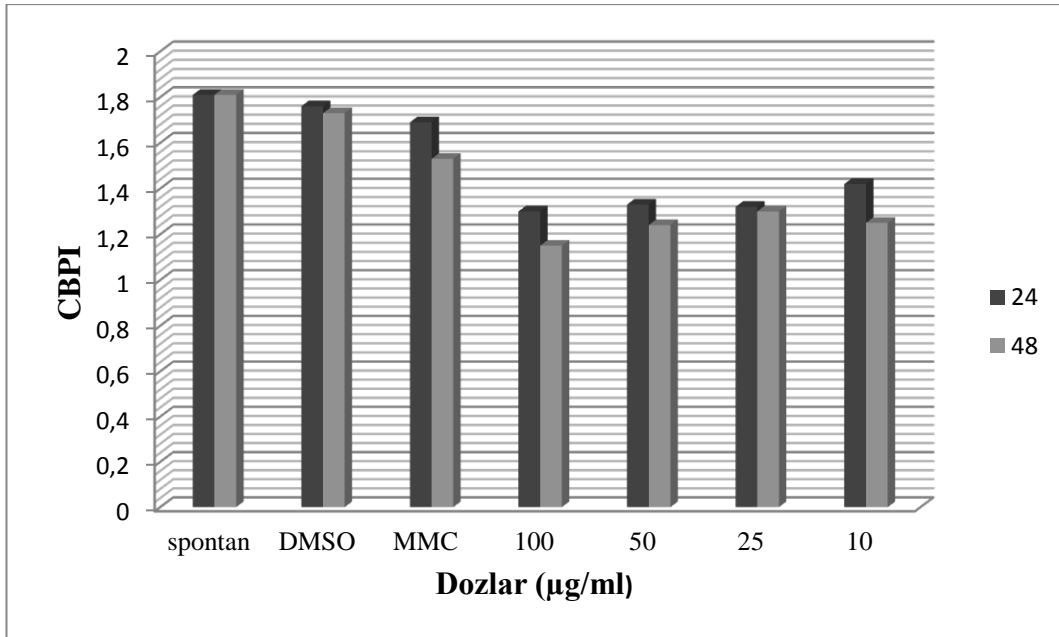
**Çizelge 3.4.** Propil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus sayısı ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı±SD (toplam MN ±SD)	CBPI±SD (hücre proliferasyon İndeksi±SD )
Spontan	24	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	7,00±0,00	1,765±0,035
MMC		0,3	2000	43,5±7,77***	1,690±0,014
Propil paraben		10	2000	15,0±2,82	1,425±0,035***
		25	2000	15,0±1,41	1,328±0,087***
		50	2000	19,0±5,65	1,335±0,049***
		100	2000	23,5±4,94*	1,303±0,066***
Spontan		48	-	2000	6,50±2,12
DMSO	20µl		2000	8,50±0,70	1,737±0,024
MMC	0,3		2000	55,5±2,12***	1,530±0,070**
Propil paraben	10		2000	17,0±1,41*	1,255±0,035***
	25		2000	17,0±2,82*	1,307±0,053***
	50		2000	23,0±4,24**	1,245±0,091***
	100		2000	26,5±4,94***	1,150±0,070***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.7. Propil parabenin MN sayısı üzerine etkisi

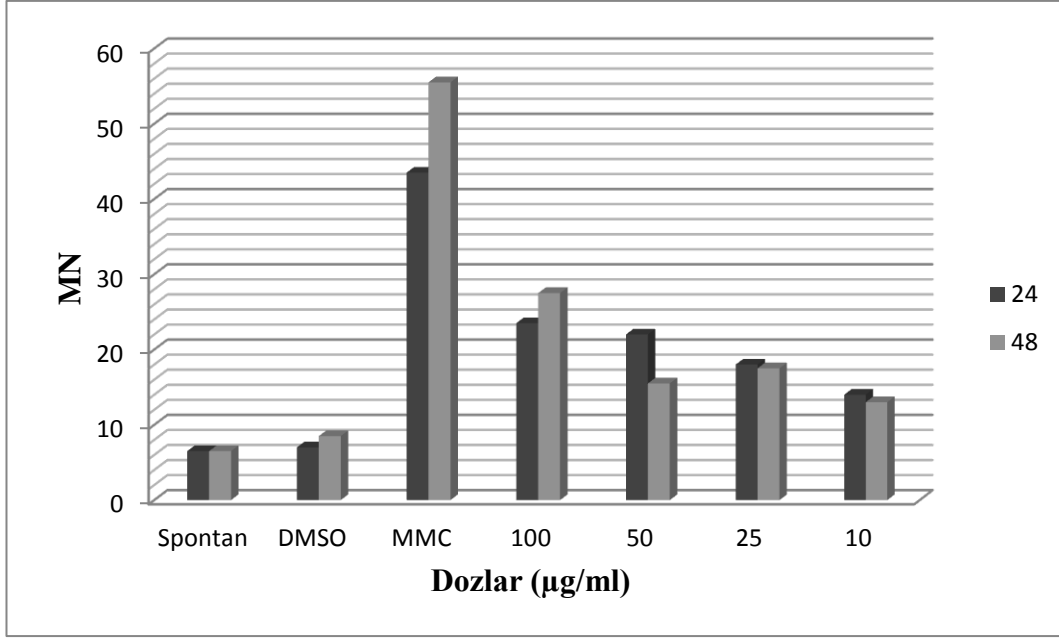


Şekil 3.8. Propil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi

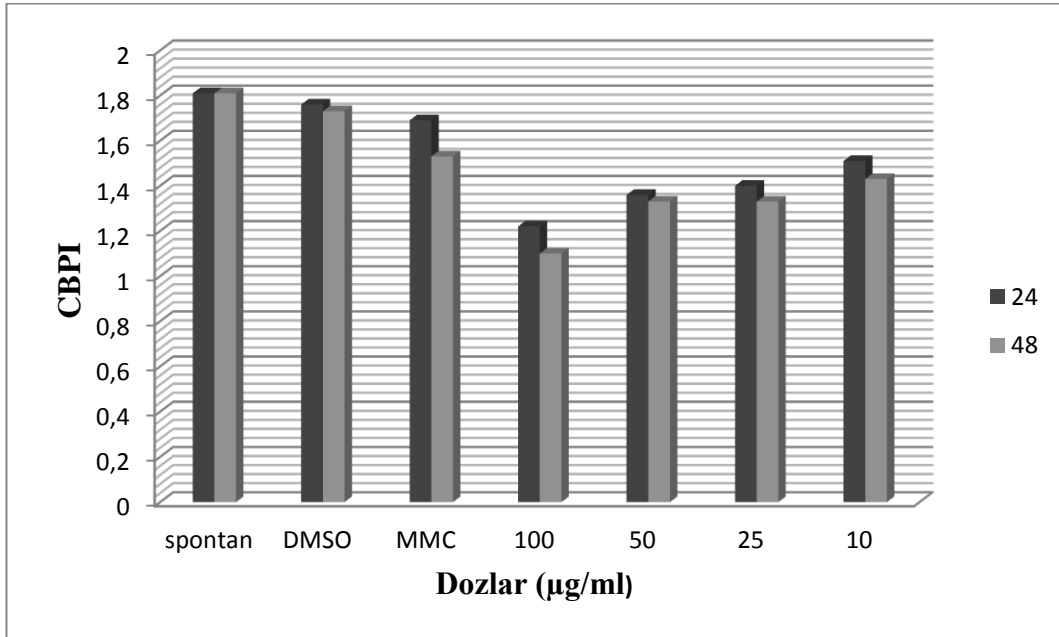
**Çizelge 3.5.** İzopropil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus frekansları ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı±SD (toplam MN ±SD)	CBPI±SD (hücre proliferasyon İndeksi±SD )
Spontan	24	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	7,00±0,00	1,765±0,035
MMC		0,3	2000	43,5±7,77***	1,690±0,014
İzopropil paraben		10	2000	14,0±7,07	1,512±0,017**
		25	2000	18,0±4,24	1,405±0,077***
		50	2000	22,0±4,24*	1,362±0,067***
		100	2000	23,5±2,12*	1,224±0,053***
Spontan	48	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	8,50±0,70	1,737±0,024
MMC		0,3	2000	55,5±2,12***	1,530±0,070**
İzopropil paraben		10	2000	13,0±1,41	1,435±0,063**
		25	2000	17,5±2,12**	1,332±0,144**
		50	2000	15,5±3,53*	1,335±0,077**
		100	2000	27,5±2,12***	1,100±0,070***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \* , \*\* , \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.9. İzopropil parabenin MN sayısı üzerine etkisi

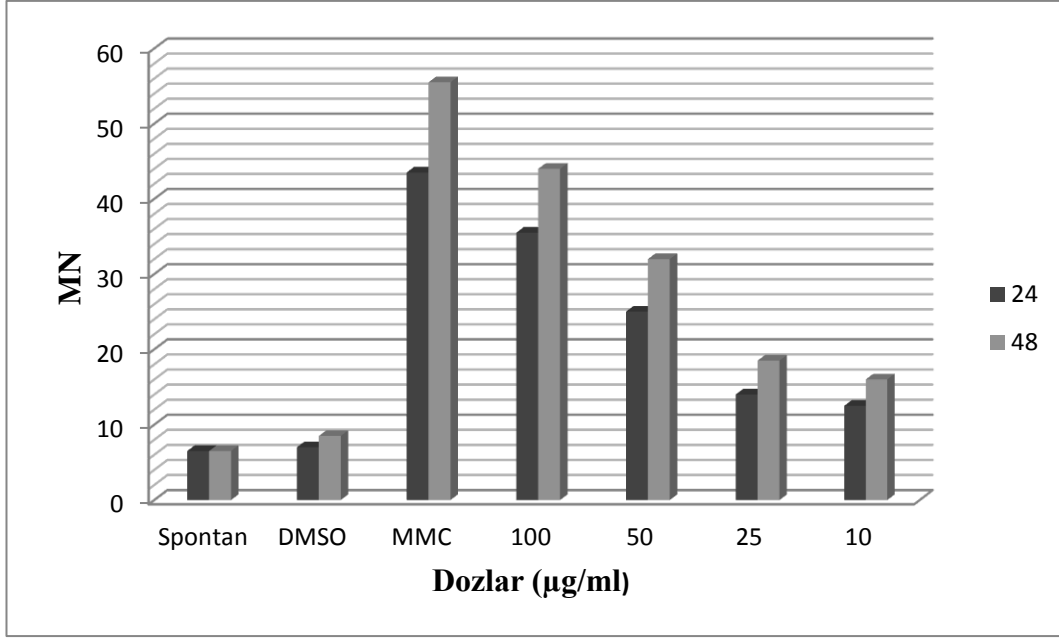


Şekil 3.10. İzopropil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi

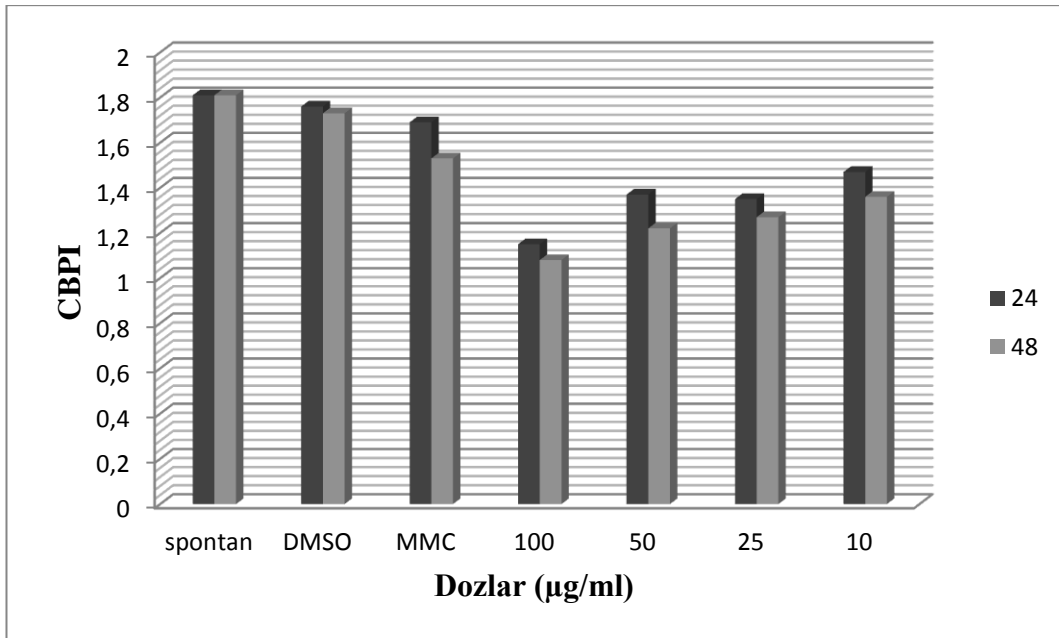
**Çizelge 3.6.** Butil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus frekansları ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı±SD (toplam MN ±SD)	CBPI±SD (hücre proliferasyon İndeksi±SD )
Spontan	24	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	7,00±0,00	1,765±0,035
MMC		0,3	2000	43,5±7,77***	1,690±0,014
Butil paraben		10	2000	12,5±3,53	1,475±0,035***
		25	2000	14,0±2,82	1,357±0,017***
		50	2000	25,0±2,82**	1,377±0,063***
		100	2000	35,5±4,94***	1,152±0,002***
Spontan		48	-	2000	6,50±2,12
DMSO	20µl		2000	8,50±0,70	1,737±0,024
MMC	0,3		2000	55,5±2,12***	1,530±0,070**
Butil paraben	10		2000	16,0±4,24	1,365±0,021***
	25		2000	18,5±6,36	1,277±0,010***
	50		2000	32,0±5,65**	1,220±0,014***
	100		2000	44,0±4,24***	1,080±0,070***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.11. Butil parabenin MN sayısı üzerine etkisi



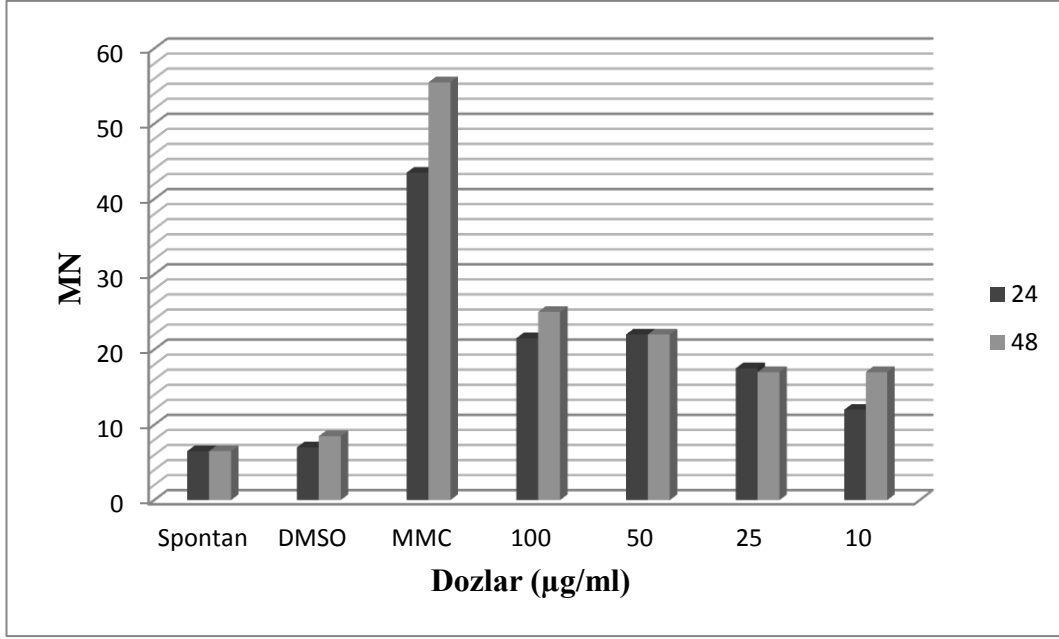
Şekil 3.12. Butil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi



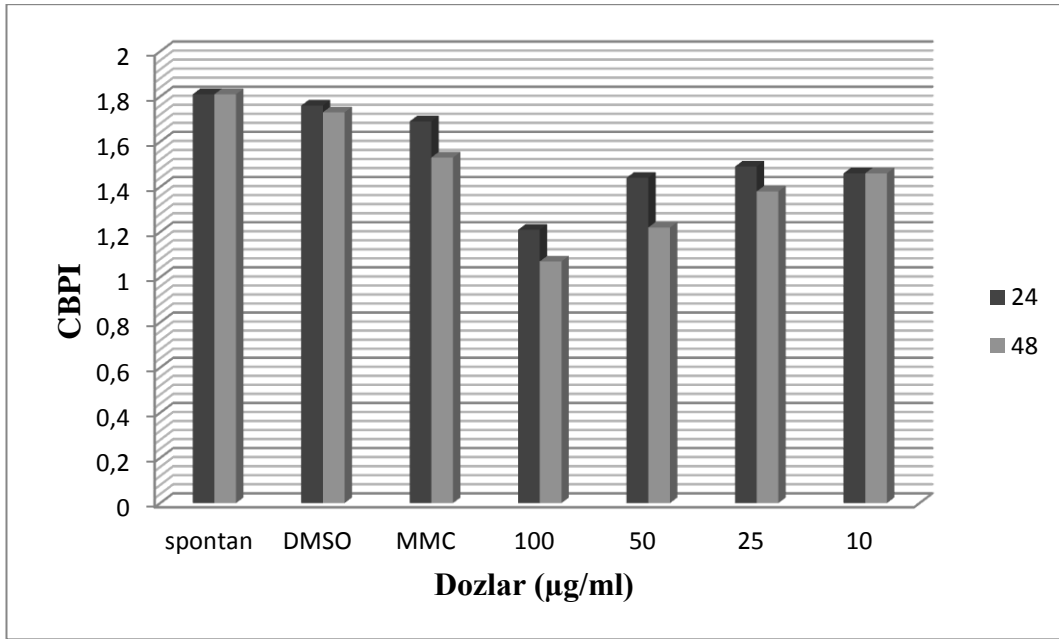
**Çizelge 3.7.** İzobutil parabenin 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfosit hücreleri üzerindeki mikronukleus frekansları ve hücre proliferasyon indeksi üzerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Sayılan binükleat hücre sayısı	MN sayısı±SD (toplam MN ±SD)	CBPI±SD (hücre proliferasyon İndeksi±SD )
Spontan	24	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	7,00±0,00	1,765±0,035
MMC		0,3	2000	43,5±7,77***	1,690±0,014
İzobutil paraben		10	2000	12,0±4,24	1,466±0,118**
		25	2000	17,5±4,94	1,495±0,041**
		50	2000	22,0±4,24*	1,447±0,060**
		100	2000	21,5±3,53*	1,211±0,083***
Spontan	48	-	2000	6,50±2,12	1,810±0,042
DMSO		20µl	2000	8,50±0,70	1,737±0,024
MMC		0,3	2000	55,5±2,12***	1,530±0,070**
İzobutil paraben		10	2000	17,0±1,41*	1,463±0,066*
		25	2000	17,0±1,41*	1,382±0,138*
		50	2000	22,0±7,07**	1,227±0,173**
		100	2000	25,0±1,41**	1,075±0,035***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.13. İzobutil parabenin MN sayısı üzerine etkisi



Şekil 3.14. İzobutil parabenin CBPI değerleri üzerindeki etkisi

Tez çalışması sonucu paraben ve türevlerinin elde edilen CBPI değerleri incelendiğinde doz artışına bağlı olarak CBPI değerlerinde tüm maddelerde düşüş olduğu ve bu düşüşün spontan kontrole karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.1-7).

Yapılan çalışma sonucunda test maddelerinin hücre proliferasyon indeksi ve mikronukleus oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde paraben maddesinin 24 ve 48 saatlik maruziyet sonunda en yüksek iki dozda negatif ve spontan kontrole göre CBPI değerlerini  $P \leq 0,001$ 'e göre çok anlamlı bir şekilde düşürdüğü, alt dozlarda ise 24 saatte CBPI'da bir düşüş olmadığı, 48 saatlik maruziyette ise 100  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda  $P \leq 0,01$ 'e göre anlamlı, 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda  $P \leq 0,05$ 'e göre istatistiki anlamlı sonuçlar olduğu belirlenmiştir. Yani bu madde yüksek dozlarda kısa süreli maruziyette CBPI'yi çok anlamlı bir şekilde düşürürken, uzun süreli maruziyette yine yüksek dozlar çok anlamlı, alt dozlar da daha düşük ama yine anlamlı sonuçlar vermiştir diyebiliriz. Bu durum paraben maddesinin lenfosit hücreleri üzerinde uzun süreli maruziyette sitotoksik etki gösterdiğinin kanıtı olduğuna işaret etmektedir.

Paraben'in türevi olan diğer tüm test maddelerinde CBPI 24 ve 48 saatlik maruziyet sürelerinde tüm kontrol değerlerine göre düşüş göstermiştir. Bu durum istatistiksel olarak değerlendirildiğinde hemen hemen tüm test maddelerinde  $P \leq 0,001$ 'e göre yüksek anlamlılık elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullandığımız MMC maddesi ise 48 saatte CBPI'da  $P \leq 0,01$ 'e göre anlamlı sonuçlar vermiştir.

Örneğin, etil, propil ve butil parabenin tüm dozları 24 ve 48 saatlik maruziyette CBPI değerlerini  $p \leq 0,001$ 'e göre yüksek derecede anlamlı bir şekilde düşürmüştür. Metil parabenin ilk üç dozu her iki maruziyet süresinde de  $p \leq 0,001$ 'e göre anlamlı şekilde CBPI'yi düşürürken, en düşük dozu da her iki maruziyet süresinde  $P \leq 0,01$ 'e göre anlamlı sonuçlar vermiştir.

İzopropil parabenin 24 saatlik maruziyette ilk üç dozunda  $p \leq 0,001$ 'e göre CBPI'yi anlamlı olarak düşürmesi, 48 saatlik maruziyette ise son üç dozunun  $P \leq 0,05$ 'e göre CBPI'yi anlamlı olarak düşürmesi bu maddenin kısa süreli maruziyette yüksek dozlarda daha sitotoksik etkiye sahip olduğuna işaret

etmektedir. Ama genel anlamda tüm dozlar her iki maruziyet süresinde de lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik etki göstermiştir.

İzobutil parabende ise ilk doz her iki süre sonunda da  $p \leq 0,001$ 'e CBPI'yi anlamlı düşürmüş, son üç doz ise 24 saatlik sürede  $P \leq 0,01$ 'e göre anlamlı değerler verirken, 48 saat sonunda son iki dozun  $P \leq 0,05$ 'e göre anlamlı değerler verdiği görülmüştür.

CBPI sonuçlarını değerlendirdiğimizde butil, etil ve propil parabenin lenfosit hücreleri üzerinde tüm dozlarda ve maruziyet sürelerinde MMC'den de yüksek sitotoksik etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz. Bu maddeleri, metil paraben sitotoksik etki değeri açısından takip ederken, izopropil ve izobutil paraben ile paraben sitotoksik açıdan en son sıralarda yer almaktadır diye bir yorum yapabiliriz.

CBMN testi sonuçlarını binükleat hücrelerden elde edilen MN sayıları açısından değerlendirdiğimizde, 24 saatteki maruziyette paraben maddesi spontan ve negatif kontrol değerleriyle karşılaştırıldığında elde edilen MN sayısı her ne kadar artmış gibi görülse de bu artış istatistiki açıdan anlamlı düzeyde görülmemiştir. 48 saatlik maruziyette ise sadece parabenin en yüksek dozunda  $P \leq 0,05$ 'e göre anlamlı MN artışı olduğu belirlenmiştir.

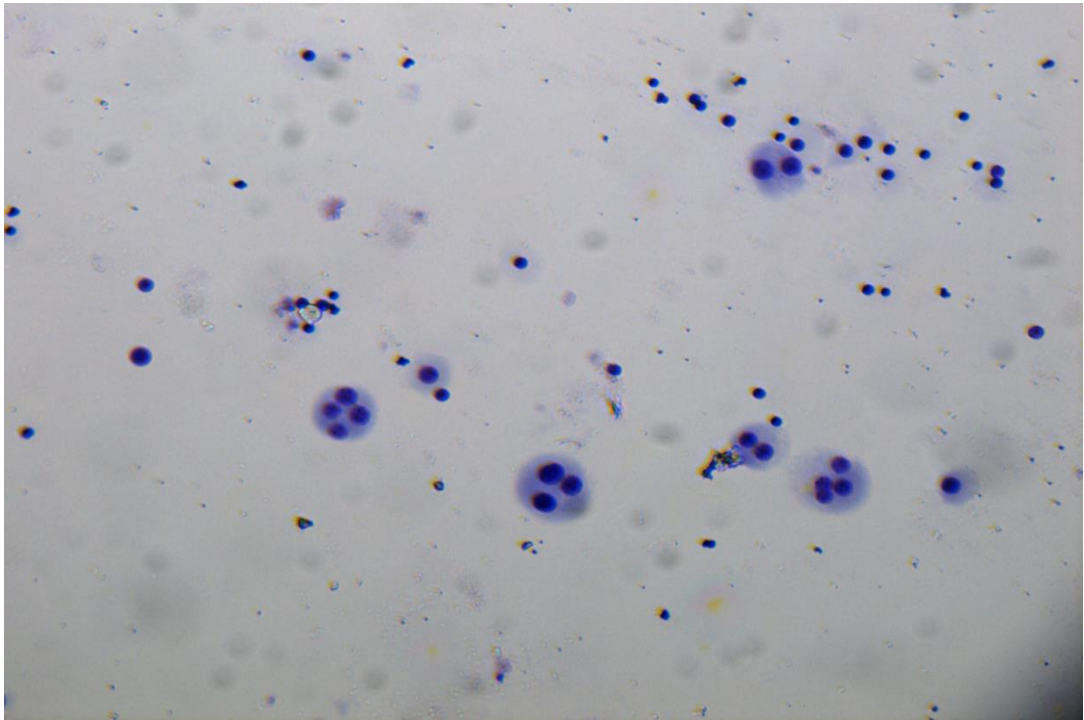
24 saatlik maruziyette metil, etil ve propil paraben sadece en yüksek doz olan 100  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda MN sayısını  $P \leq 0,05$ 'e göre anlamlı olarak arttırırken, 48 saatlik maruziyette propil paraben tüm dozlarda farklı anlamlılık derecelerinde MN sayısını arttırmıştır. Metil paraben 48 saatte en yüksek üç dozda, etil paraben ise en yüksek iki dozda istatistiki açıdan farklı anlamlılıklarda değerler vermiş ve MN sayısını arttırmıştır.

Butil paraben, her iki maruziyet süresinde de MN sayısında anlamlı artışa yol açmıştır. 100  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda her iki sürede de  $p \leq 0,001$ 'e göre yüksek derecede anlamlı, 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda her iki sürede de  $p \leq 0,01$ 'e göre önemli derecede anlamlı değerler vermiştir.

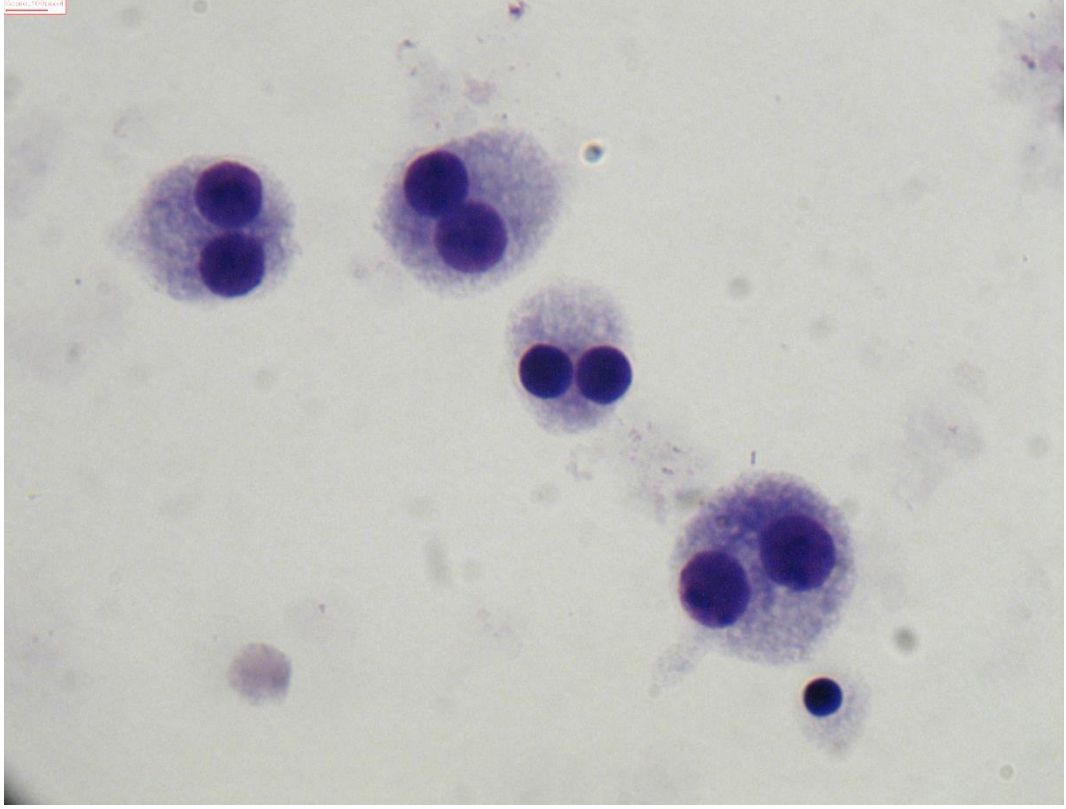
İzopropil ve izobutil paraben 24 saatte 100 ve 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda  $P \leq 0,05$ 'e göre anlamlı bulunurken, 48 saatte izobutil tüm dozlarda farklı

anlamlılıklar, izopropil son doz dışında tüm dozlarda farklı anlamlılık değerleri vererek MN sayısını arttırmıştır.

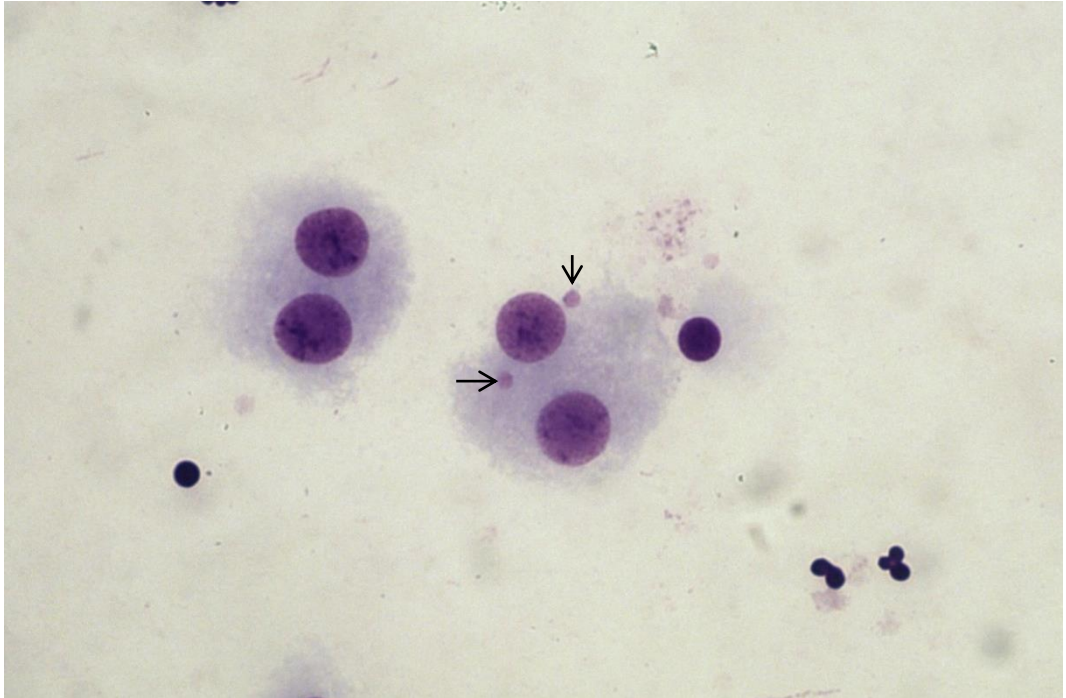
Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde kısa süreli maruziyette genel olarak sadece en yüksek dozda MN sayısı artarken, uzun süreli maruziyette her maddenin farklı doz aralıklarında mn sayısı artışında daha fazla anlamlı değerler görülmüş ve uzun süreli maruziyette test maddelerinin lenfosit hücreleri üzerinde genotoksik etkisinin daha da yüksek olabileceği sonucuna varılmıştır. Tüm test maddeleri içinde ise butil parabenin lenfosit hücreleri üzerinde doz artışına bağlı olarak genotoksik hasarın bir göstergesi olan MN oluşumunu yüksek derecede uyarak diğer maddelerden daha anlamlı sonuçlar verdiğini görmekteyiz. Test maddelerini kendi arasında CBPI ve MN sonuçları açısından değerlendirdiğimizde CBPI'daki azalmaya bağlı olarak test maddelerinin sitotoksik etkileri açısından butil=propil=etil > metil>izobutil >paraben şeklinde bir sıralama yapabiliriz. MN sayısındaki artış ve genotoksik etki açısından değerlendirdiğimizde ise butil >izobutil >propil >izopropil >etil >metil >paraben şeklinde bir sıralama yapabiliriz.



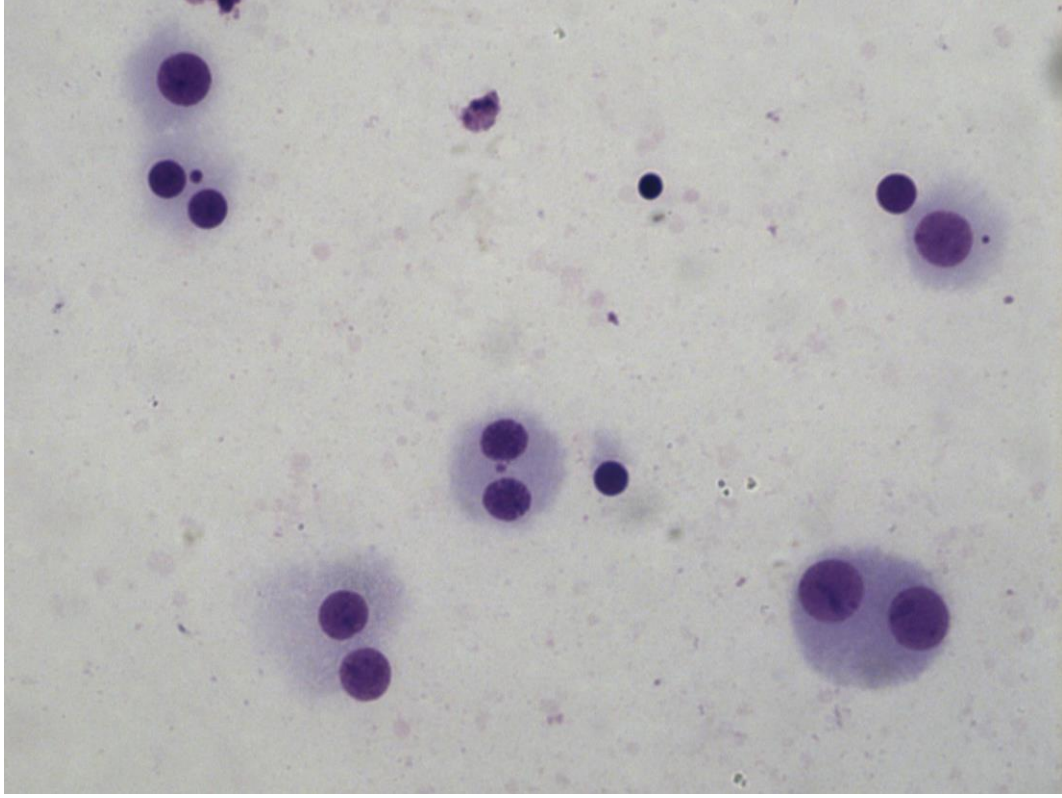
**Şekil 3.15.** Tek çekirdekli, iki çekirdekli, üç çekirdekli ve dört çekirdekli hücreler (400x)



Şekil 3.16. İki çekirdekli (binükleat) hücreler (1000x)



Şekil 3.17. İki mikronukleuslu binükleat hücre (1000x)



Şekil 3.18. Mikronükleus içeren ve içermeyen binükleat hücreler (400x)

### 3.2. Paraben ve Türevlerinin Kromozom Aberasyonu ve Mitotik İndeks Üzerine Etkileri

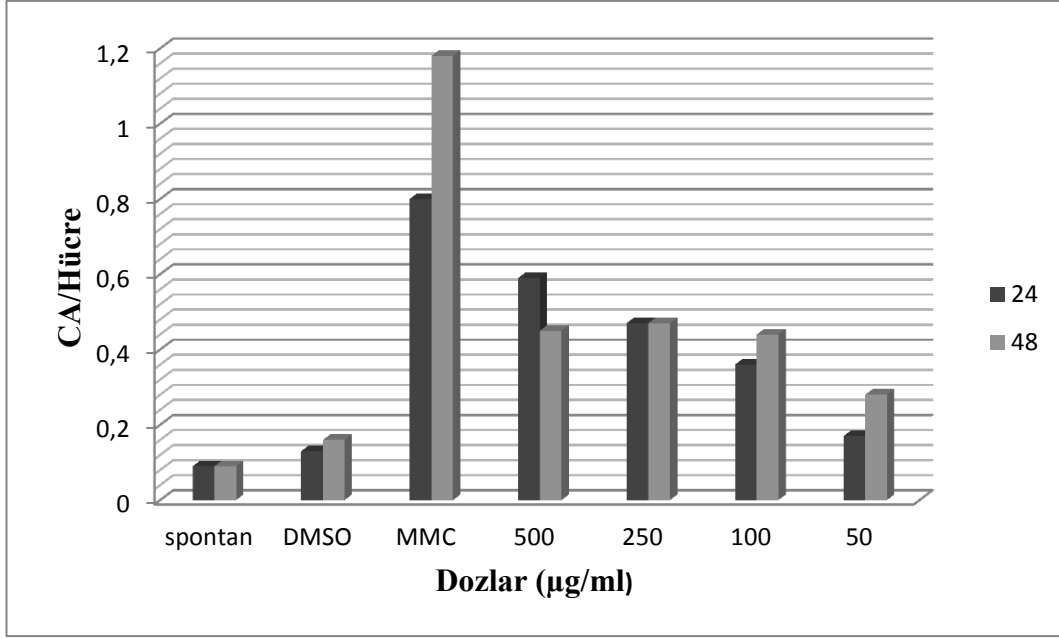
Kromozom aberasyon (CA) testi kültüre alınmış insan periferal kan lenfositlerinde kromozomal anormallik frekansının belirlenmesinde kullanılan ve genotoksik maddelere maruziyeti ya da maruziyetin biyolojik etkilerini değerlendirerek genetik hasarın boyutunu saptayan hassas bir yöntemdir. Yapısal değişimler, kromozomal anormallik tekniği kullanılarak, mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilir. Kromozom aberasyon testi kapsamında değerlendirilen diğer bir metod da mitotik indeksin belirlenmesidir. Mitotik indeks değerlerindeki düşüş sitotoksitenin bir göstergesidir. Kromozom aberasyon testi kapsamında metafaz aşamasındaki kromozomlarda 5 tip anomali değerlendirilmiş ve iki vericiden elde edilen verilere göre toplam anomaliler tablolarında verilmiş, hücre başına düşen kromozom aberasyonları ve mitotik indeks değerleri istatistiksel olarak değerlendirilerek belirlenmiştir (Çizelge 3.8 -14).

**Çizelge 3.8.** Parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

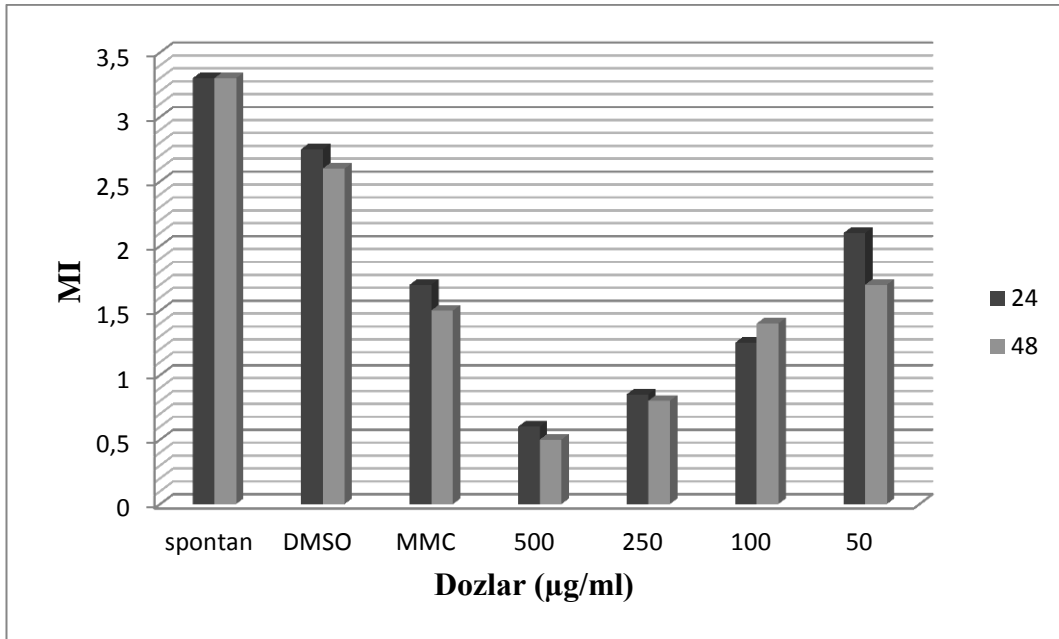
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre± SD	MI±SD	
				K <sup>2</sup>	K <sup>22</sup>	S U	DS	R			
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42	
DMSO		20µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35	
MMC		0,3	200	27	117	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14**	
Paraben		50	200	1	18	11	4	-	0,170±0,014	2,10±0,14**	
		100	200	8	41	18	6	-	0,365±0,007	1,25±0,21** *	
		250	200	21	45	16	11	2	0,475±0,106	0,85±0,07** *	
		500	200	20	56	21	20	1	0,590±0,169 *	0,60±0,14** *	
Spontan		48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO			20µl	200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC			0,3	200	34	183	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
Paraben	50		200	3	27	20	3	-	0,285±0,007	1,70±0,14**	
	100		200	7	49	25	3	-	0,440±0,028 *	1,40±0,14** *	
	250		200	19	46	20	10	-	0,475±0,205 *	0,80±0,14** *	
	500		200	15	39	22	15	-	0,455±0,176 *	0,50±0,14** *	

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)





Şekil 3.19. Parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi

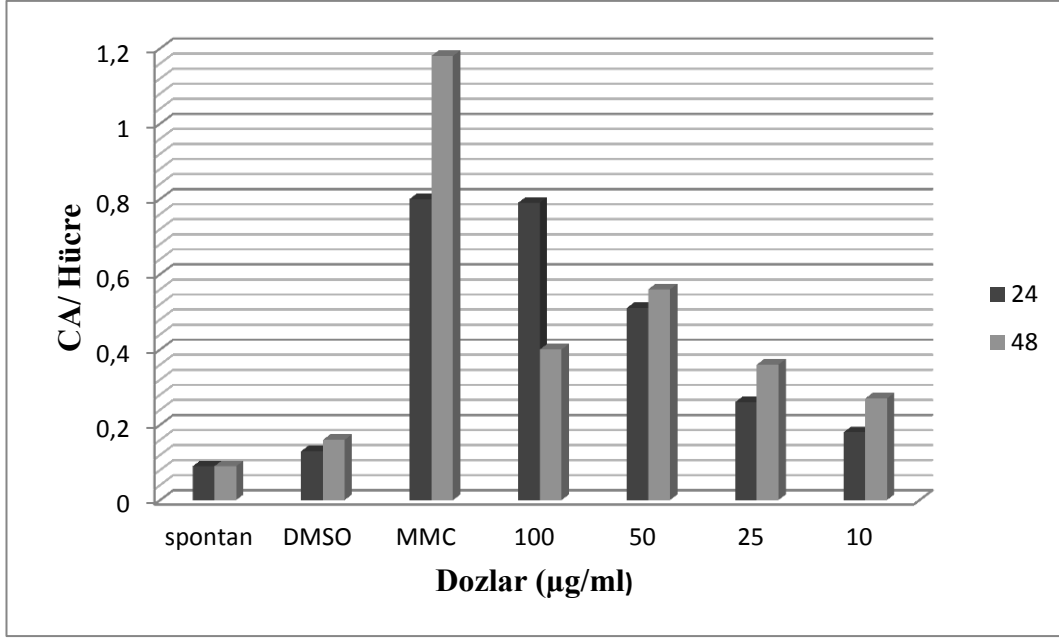


Şekil 3.20. Parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

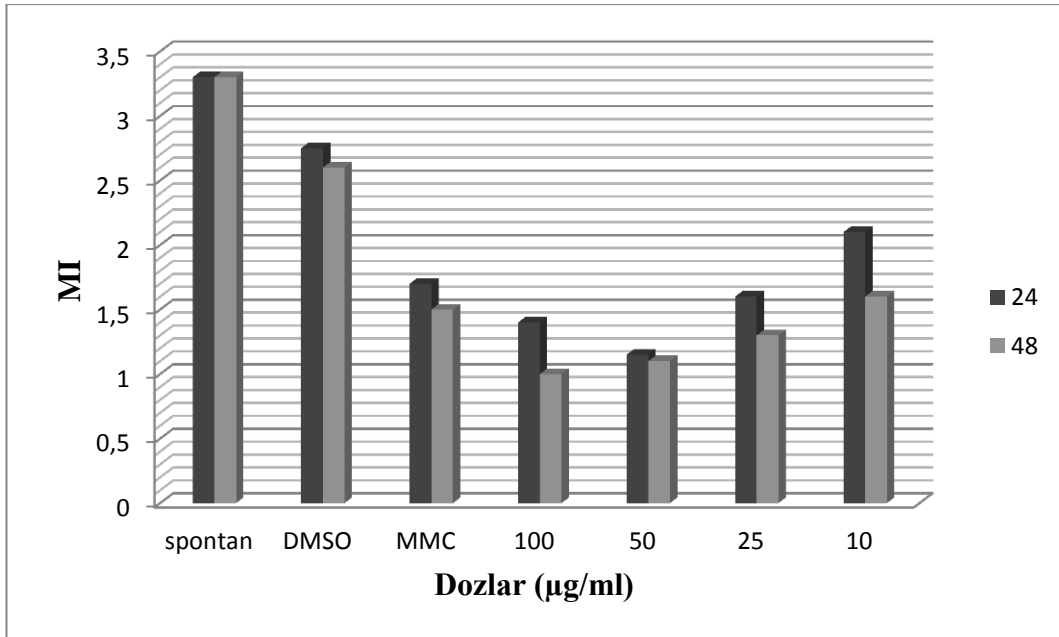
**Çizelge 3.9.** Metil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre ±SD	MI±SD
				K'	K''	SU	D S	R		
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35
MMC		0,3	200	27	117	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14 **
Metil paraben		10	200	1	25	8	3	-	0,185±0,007	2,10±0,28 **
		25	200	6	32	7	7	-	0,260±0,155	1,60±0,00 ***
		50	200	26	39	18	18	2	0,515±0,049 **	1,15±0,21 ***
		100	200	30	80	22	25	1	0,790±0,113 ***	1,40±0,14 ***
Spontan	48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC		0,3	200	34	183	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
Metil paraben		10	200	3	35	14	2	-	0,270±0,028	1,60±0,14 **
		25	200	4	43	23	3	1	0,365±0,134 *	1,30±0,00 **
		50	200	20	48	26	18	-	0,560±0,084 ***	1,10±0,70 **
		100	200	18	36	12	15	-	0,405±0,035 **	1,00±0,28 **

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.21. Metil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi

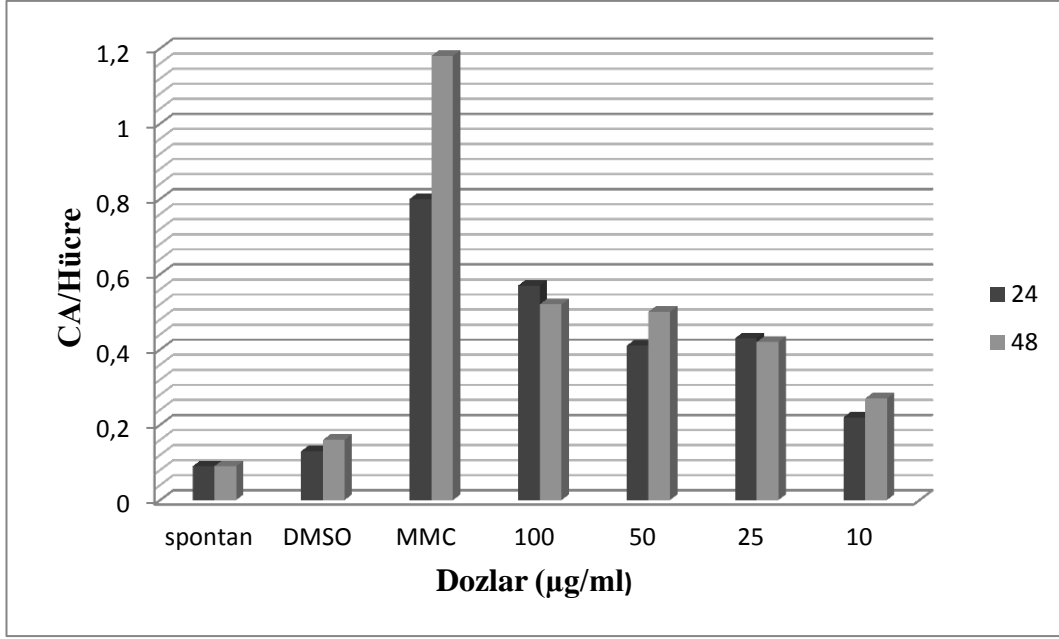


Şekil 3.22. Metil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

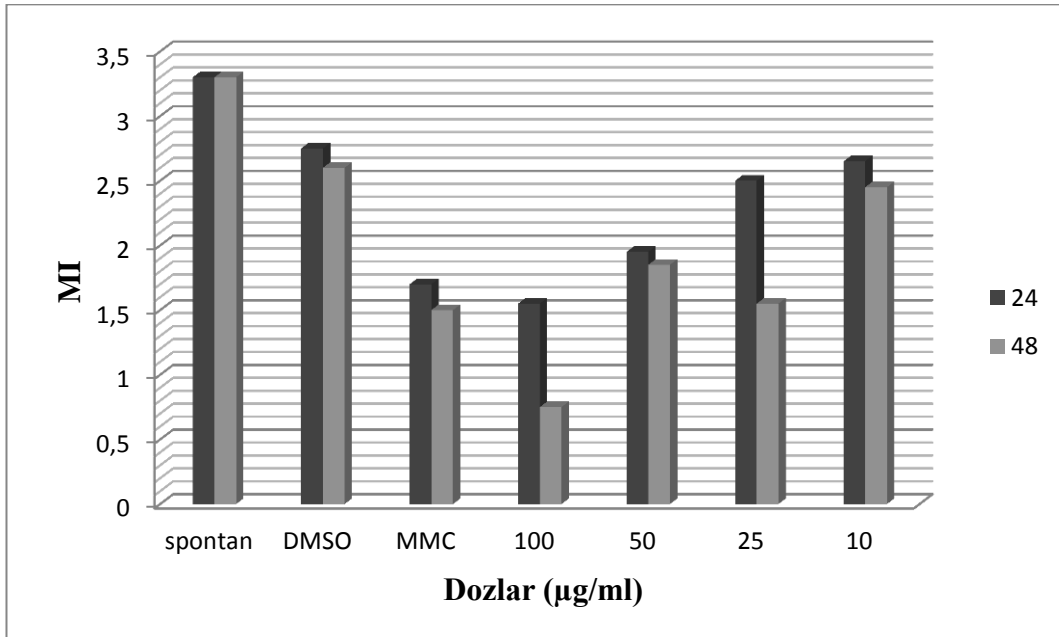
**Çizelge 3.10.** Etil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre ±SD	MI±SD	
				K'	K''	S U	D S	R			
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42	
DMSO		20µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35	
MMC		0,3	200	27	117	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14 **	
Etil paraben		10	200	2	29	6	7	-	0,220±0,056	2,65±0,07	
		25	200	6	53	7	20	-	0,430±0,113 *	2,50±0,14	
		50	200	8	54	16	5	-	0,415±0,007 *	1,95±0,21 **	
		100	200	21	60	19	14	-	0,570±0,183 **	1,55±0,49 **	
Spontan		48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO			20µl	200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC			0,3	200	34	183	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
Etil paraben	10		200	2	28	17	7	-	0,270±0,056	2,45±0,49	
	25		200	4	49	16	15	-	0,420±0,254	1,55±0,35 *	
	50		200	19	43	27	12	-	0,505±0,190	1,85±0,63 *	
	100		200	20	61	13	8	2	0,520±0,197	0,75±0,35 **	

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.23. Etil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi

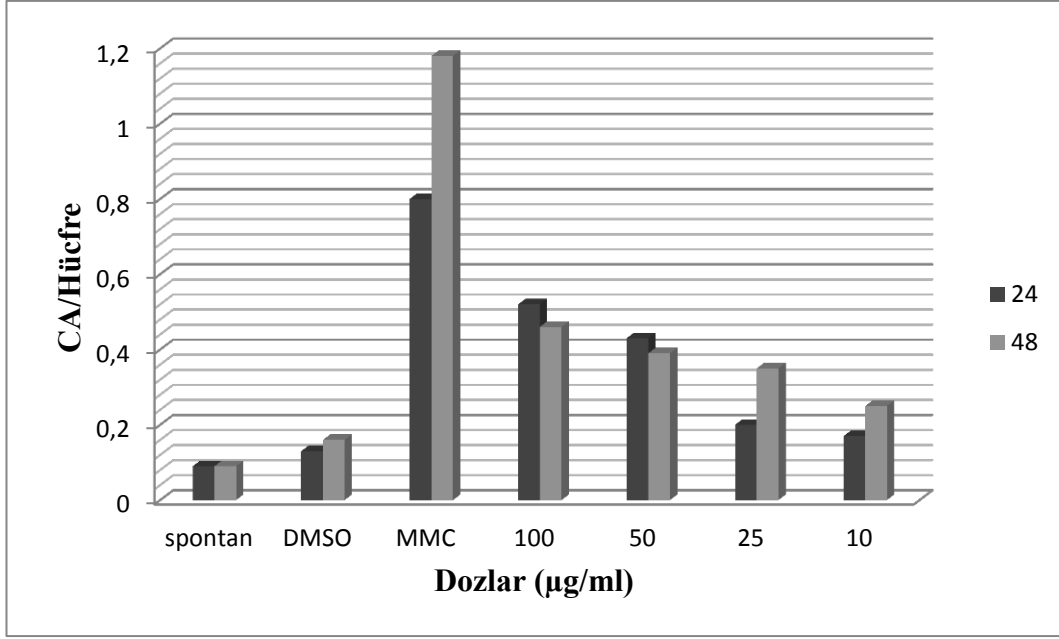


Şekil 3.24. Etil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

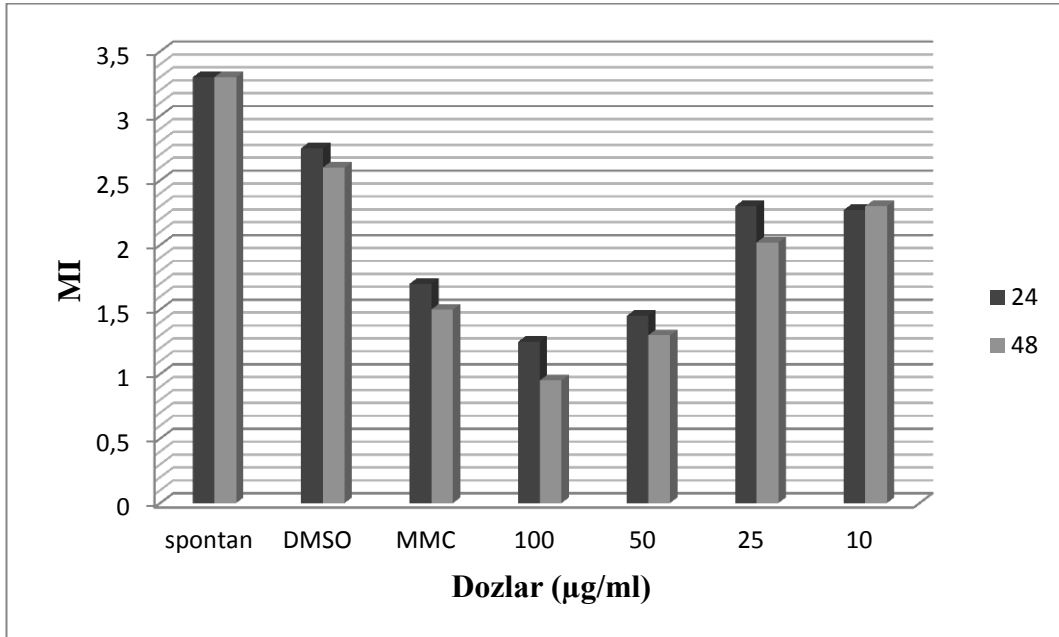
**Çizelge 3.11.** Propil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre ±SD	MI±SD
				K '	K ''	S U	D S	R		
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20 µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35
MMC		0,3	200	27	11 7	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14**
Propil paraben		10	200	-	18	5	11	-	0,170±0,014	2,27±0,17
		25	200	2	24	9	5	1	0,205±0,021	2,30±0,56
		50	200	11	42	25	8	1	0,435±0,120 **	1,45±0,21**
		100	200	7	57	21	19	1	0,525±0,106 **	1,25±0,35**
Spontan		48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021
DMSO	20 µl		200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC	0,3		200	34	18 3	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
Propil paraben	10		200	1	28	17	5	-	0,255±0,007 **	2,30±0,14*
	25		200	6	45	13	6	-	0,350±0,056 ***	2,02±0,38**
	50		200	6	42	18	13	-	0,395±0,035 ***	1,30±0,14** *
	100		200	2	64	19	8	-	0,465±0,007 ***	0,95±0,07** *

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.25. Propil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi



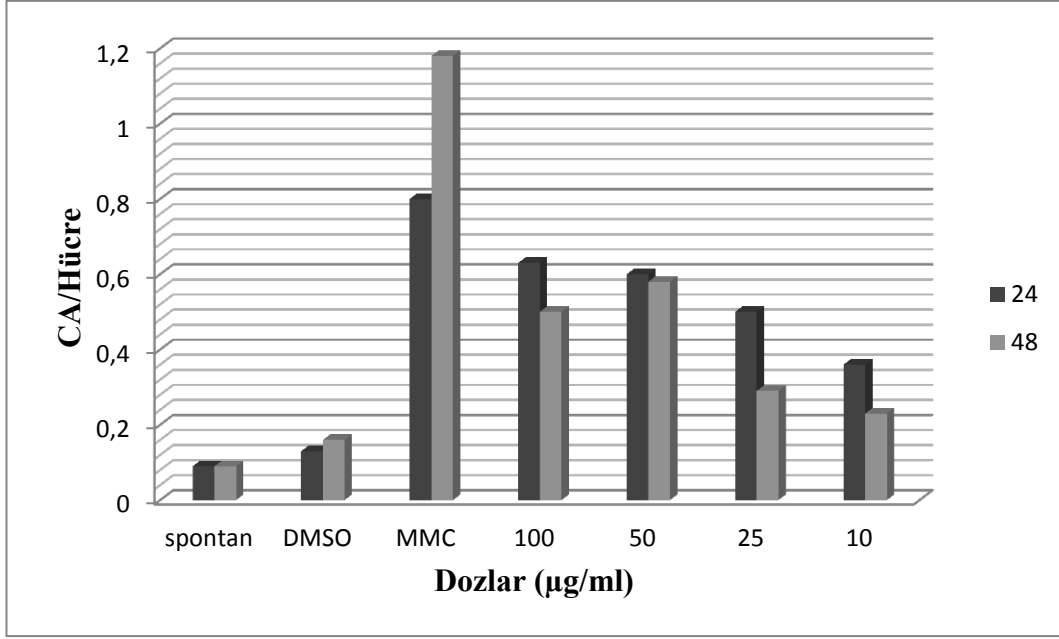
Şekil 3.26. Propil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

**Çizelge 3.12.** İzopropil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

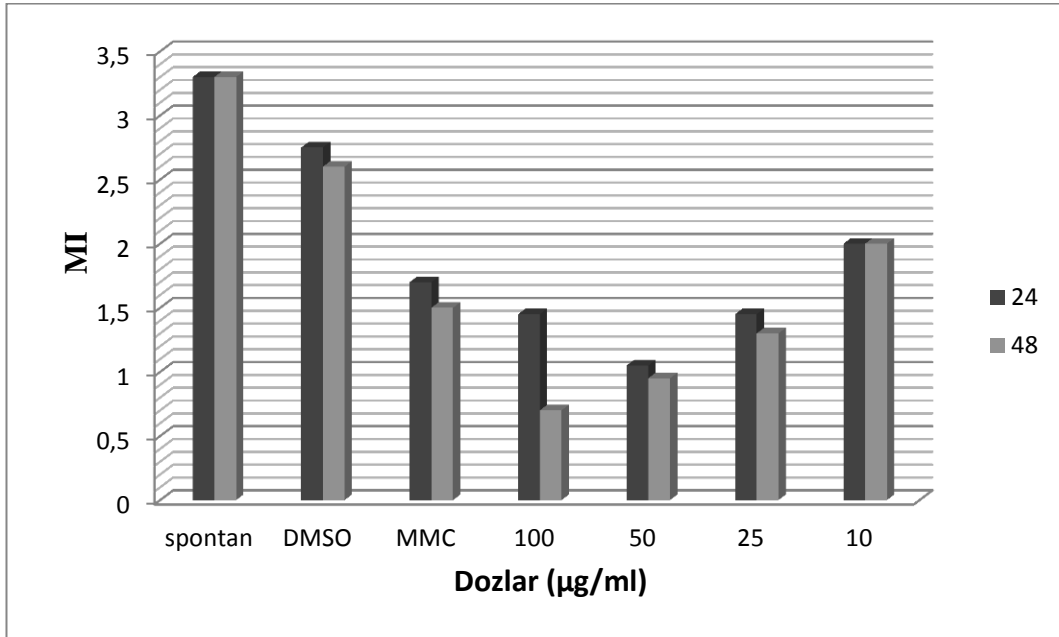
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre ±SD	MI±SD
				K	K''	S	D	R		
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35
MMC		0,3	200	27	117	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14 **
İzo-propil paraben		10	200	2	52	10	9	-	0,365±0,021	2,00±0,14 **
		25	200	9	64	13	15	-	0,505±0,007 *	1,45±0,49 **
		50	200	17	64	15	24	-	0,600±0,240 **	1,05±0,21 ***
		100	200	26	48	29	23	1	0,635±0,035 **	1,45±0,07 **
Spontan	48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC		0,3	200	34	183	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
İzo-propil paraben		10	200	-	43	3	-	-	0,230±0,056	2,00±0,56 *
		25	200	4	44	6	5	-	0,295±0,106	1,30±0,56 **
		50	200	16	54	27	15	-	0,585±0,106 *	0,95±0,21 **
		100	200	13	57	13	17	1	0,505±0,318	0,70±0,14 ***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P<0,05; 0,01; 0,001 (Dunnnett-t test)





Şekil 3.27. İzopropil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi

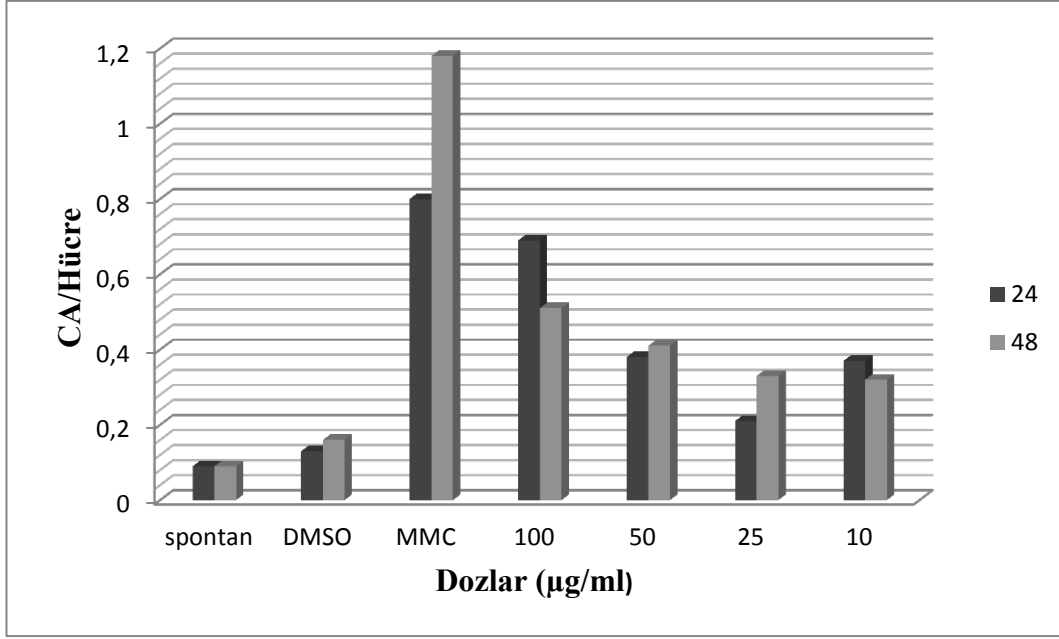


Şekil 3.28. İzopropil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

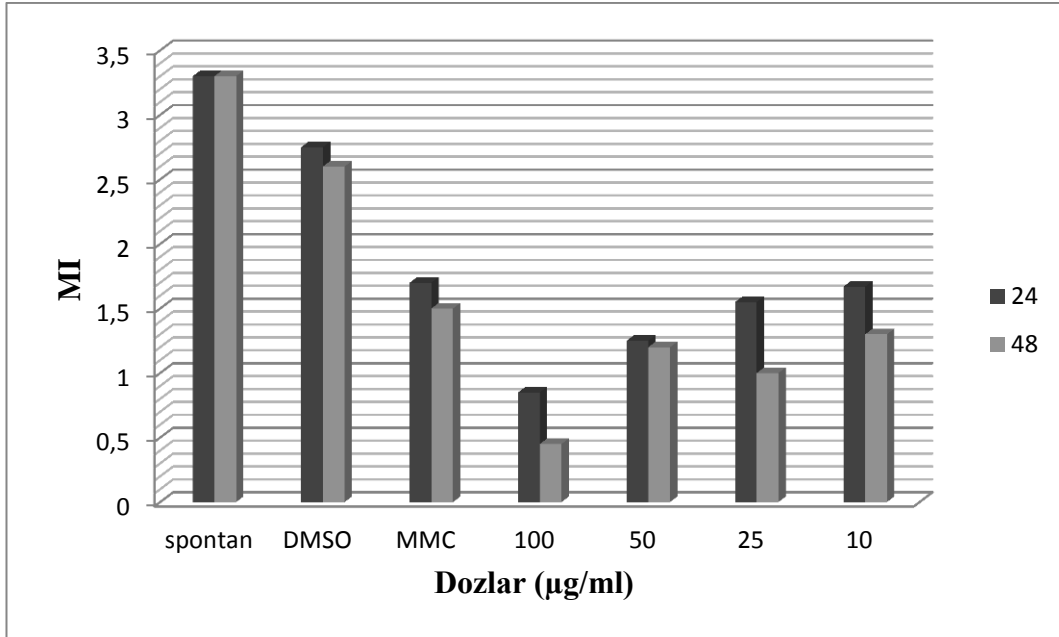
**Çizelge 3.13.** Butil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre ±SD	MI±SD
				K'	K''	SU	D S	R		
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35
MMC		0,3	200	27	117	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14 **
Butil paraben		10	200	6	52	9	8	-	0,375±0,162	1,67±0,31 **
		25	200	5	28	5	3	1	0,210±0,014	1,55±0,07 ***
		50	200	22	37	14	3	-	0,380±0,042	1,25±0,07 ***
		100	200	40	81	8	9	-	0,690±0,226 **	0,85±0,07 ***
Spontan		48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021
DMSO	20µl		200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC	0,3		200	34	183	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
Butil paraben	10		200	-	46	12	7	-	0,325±0,063	1,30±0,14 ***
	25		200	2	43	14	7	-	0,330±0,169	1,00±0,14 ***
	50		200	15	45	17	6	-	0,415±0,190	1,20±0,14 ***
	100		200	38	62	-	2	-	0,510±0,197 *	0,45±0,07 ***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.29. Butil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi

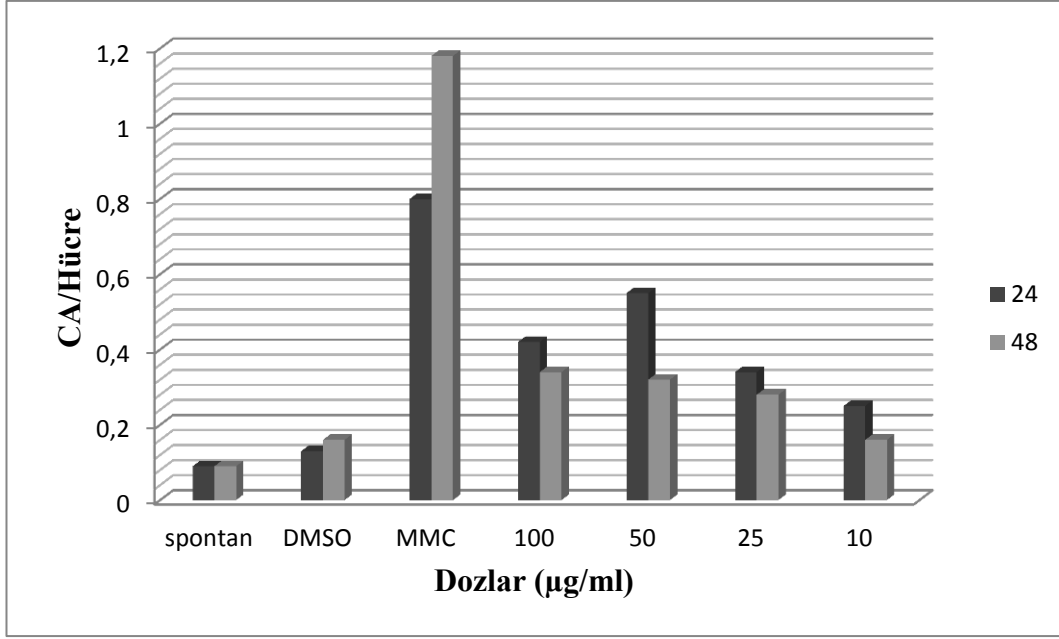


Şekil 3.30. Butil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

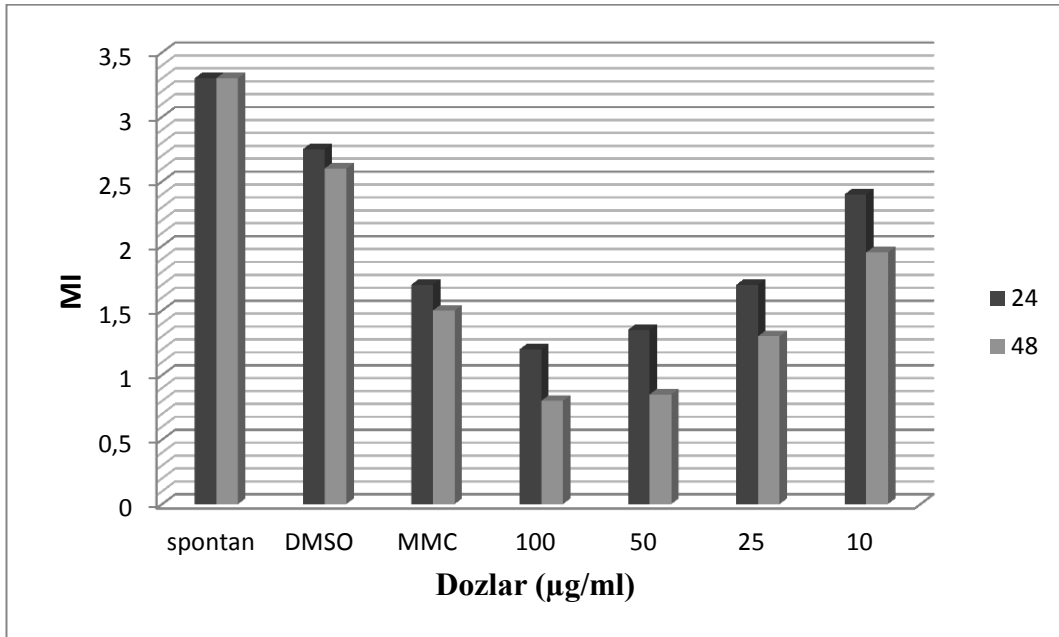
**Çizelge 3.14.** İzobutil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette kromozom aberasyonu ve mitotik indeks üzerine etkisi

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	Aberasyonlar					CA/hücre ±SD	MI±SD
				K'	K''	S U	D S	R		
Spontan	24	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	1	13	7	5	-	0,130±0,014	2,75±0,35
MMC		0,3	200	27	117	5	11	-	0,800±0,070 ***	1,70±0,14 **
İzobutil paraben		10	200	4	31	9	7	-	0,255±0,021	2,40±0,14 **
		25	200	11	32	20	6	-	0,345±0,049	1,70±0,00 **
		50	200	17	54	21	18	1	0,555±0,091 *	1,35±0,07 ***
	100	200	10	34	29	12	-	0,425±0,261 *	1,20±0,14 **	
Spontan	48	-	200	-	17	1	1	-	0,095±0,021	3,30±0,42
DMSO		20µl	200	3	17	2	7	-	0,160±0,014	2,60±0,42
MMC		0,3	200	34	183	10	10	-	1,185±0,035 ***	1,50±0,14
İzobutil paraben		10	200	1	29	3	-	-	0,165±0,007	1,95±0,21 *
		25	200	2	36	8	10	-	0,280±0,098 *	1,30±0,70 **
		50	200	5	47	5	8	-	0,325±0,035 **	0,85±0,35 **
	100	200	3	52	12	2	-	0,345±0,021 **	0,80±0,14 **	

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)



Şekil 3.31. İzobutil parabenin hücre başına düşen kromozom aberasyonu üzerine etkisi



Şekil 3.32. İzobutil parabenin Mitotik İndeks üzerine etkisi

24 saatlik maruziyette Mitotik indeks (MI) değerlerini incelediğimizde paraben ve metil parabenin ilk üç dozunda  $p \leq 0,001$ 'e göre yüksek anlamlılıkta MI değerlerinde kontrol grubuna göre düşüşler görülürken, paraben 48 saatte de aynı anlamlılık, metil paraben ise tüm dozlarda  $p \leq 0,01$ 'e göre MI düşüşünde anlamlılık göstermiştir (Çizelge 3.8- 3.9.).

Etil ve propil paraben sadece en yüksek iki dozda  $p \leq 0,01$ 'e göre MI değerlerini anlamlı bir şekilde düşürürken, propil parabenin metil parabene göre tüm dozlarda ve yüksek anlamlılık değerlerinde MI'ı düşürdüğü belirlenmiştir (Çizelge 3.9-3.11).

İzopropil ve izobutil paraben 24 saatte tüm dozlarda aynı değerlerde anlamlı MI düşüşlerine yol açarken, 48 saatlik maruziyette farklı ama yine anlamlı MI düşüşleri sergilemişlerdir (Çizelge 3.12-3.14).

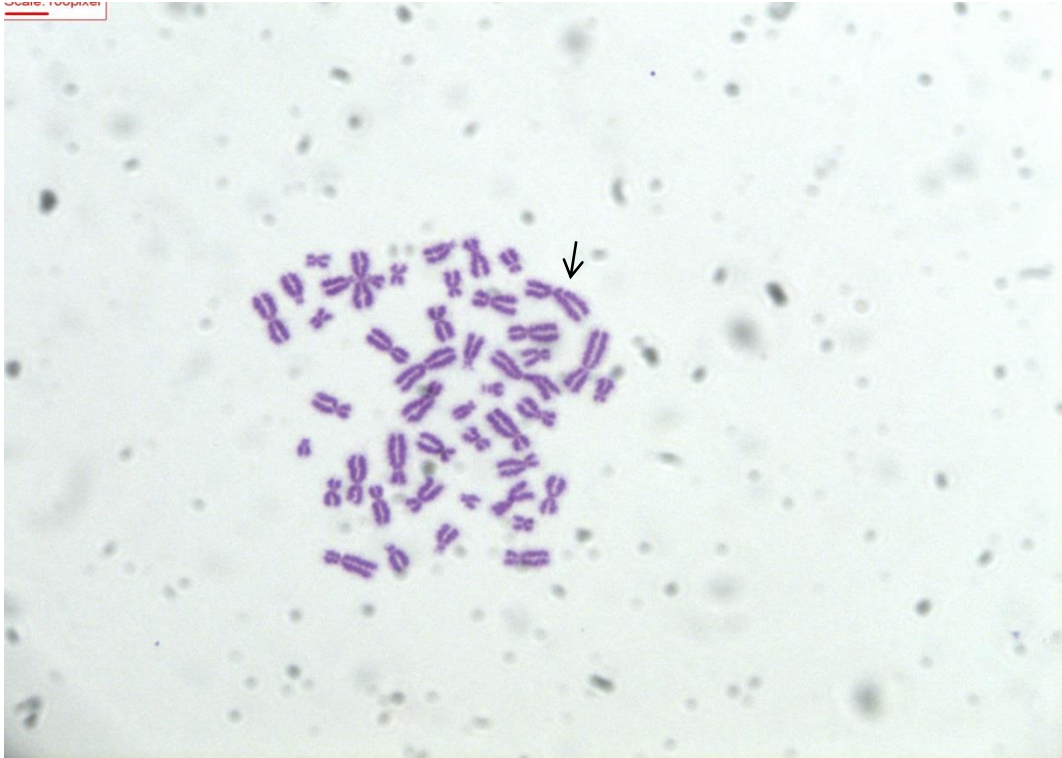
Diğer maddelerden farklı olarak butil parabenin her iki maruziyet süresinde ve hemen hemen tüm dozlarda diğer paraben ve türevlerinden daha yüksek anlamlılıkta ( $p \leq 0,001$ ) MI değerlerinde düşüşe yol açtığı görülmektedir (Çizelge 3.13.). Bu sonuçları incelediğimizde hücreler üzerinde butil parabenin mitotik inhibisyon etkisi yaparak sitotoksik bir etkiye sahip olduğu söylenebilmektedir. Test maddelerinden elde edilen sonuçlara bakıldığında tüm maddelerde ve tüm dozlarda da özellikle 48 saatlik maruziyette daha düşük MI değerlerinin elde edilmesi maddelerin süreye de bağlı olarak hücre bölünmesini engelleyici yani sitotoksik bir etkiye sahip olduklarını düşündürmektedir. Maddelerimiz mitotik indeksteki azalma açısından maruziyet süresine de bağlı olarak butil > paraben > metil > izobutil > propil > izopropil > etil paraben gibi sitotoksik etki sıralamasına sokulabilir.

Hücre başına düşen kromozom aberasyonlarını değerlendirdiğimizde; parabenin 24 saatte 100  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda  $p \leq 0,05$ 'e göre anlamlı sonuçlar verdiği görülürken 48 saatlik maruziyette ilk üç dozda bu derecede anlamlı sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Diğer paraben türevleri 24 saat için genel olarak incelendiğinde en yüksek ilk iki dozda farklı anlamlılık değerlerinde hücre başına düşen kromozom aberasyonunu arttırmıştır. Bu anlamlılık için metil> izopropil> propil> etil> butil> izobutil şeklinde bir sıralama yapabiliriz. 48 saatlik

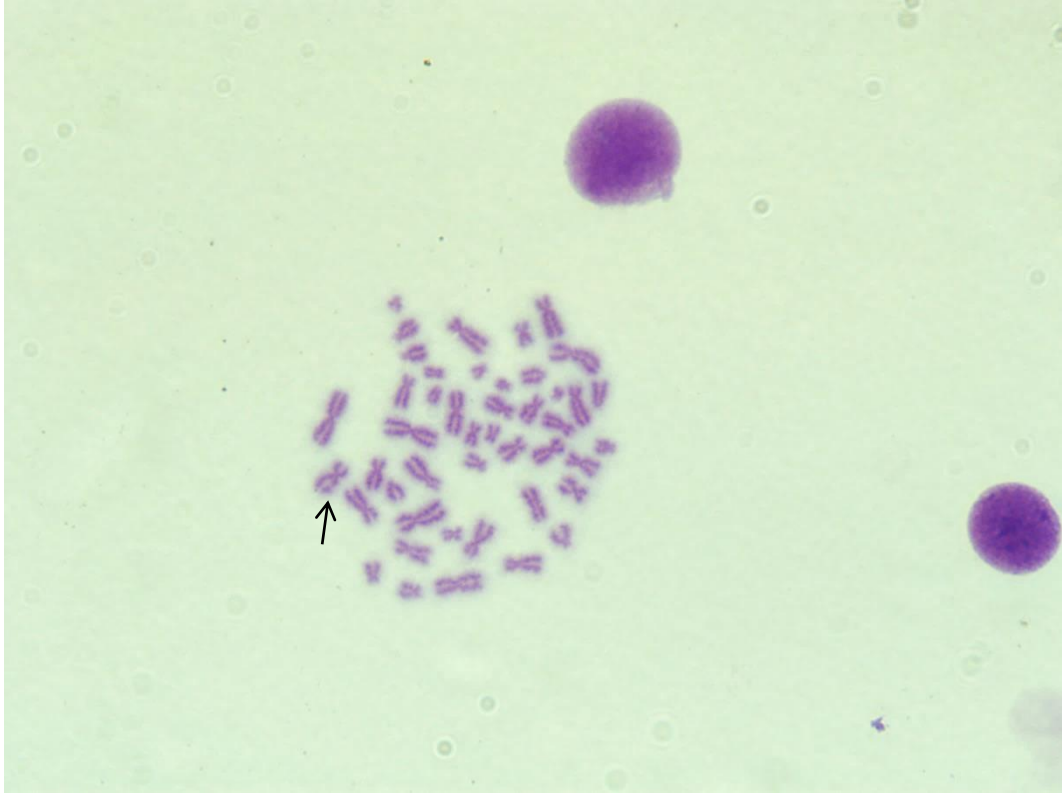
maruziyette ise etil parabende istatistiki bir anlamlı artış görülmezken, Propilde tüm dozlarda 24 saate göre çok daha yüksek anlamlılıkta kromozom aberasyon artışı olduğu dikkat çekmektedir. Paraben 48 saatte 24 saate göre daha alt dozlarda da anlamlı sonuçlar vermiştir ( $p \leq 0,05$ ).

48 saatlik maruziyet sonucunda butil parabenin sadece en yüksek dozda  $p \leq 0,05$ 'e göre kromozom aberasyonlarında anlamlı artış yol açtığı görülürken, izobutil parabenin ise doz artışına bağlı olarak kromozom aberasyonundaki artış açısından butil parabenden daha etkili olduğu söylenebilir (Çizelge 3.13- 3.14.)

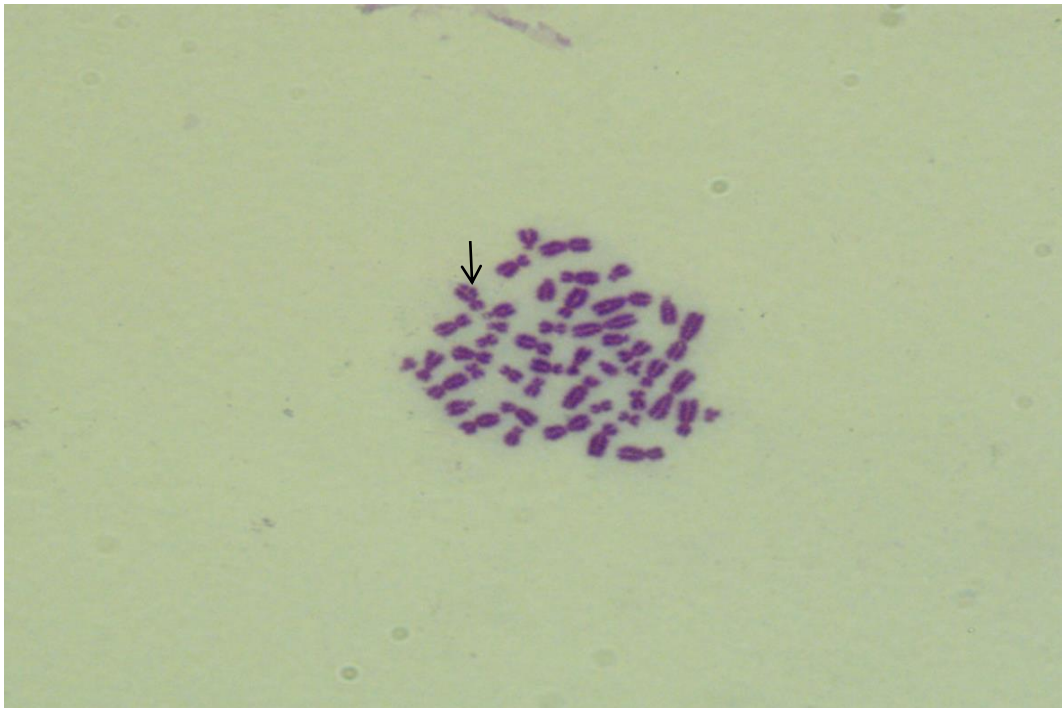
İzopropil paraben ise kısa süreli maruziyet olan 24 saatte doza bağlı olarak anlamlı bir şekilde kromozom aberasyonunu arttırırken, uzun süreli maruziyette sadece 50  $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozda  $p \leq 0,05$ 'e göre anlamlı bir artış göstermiştir (Çizelge 3.12.).



**Şekil 3.33.** Kromatid kırığı (1000x)



Şekil 3.34. Kromatid kırığı (1000x)

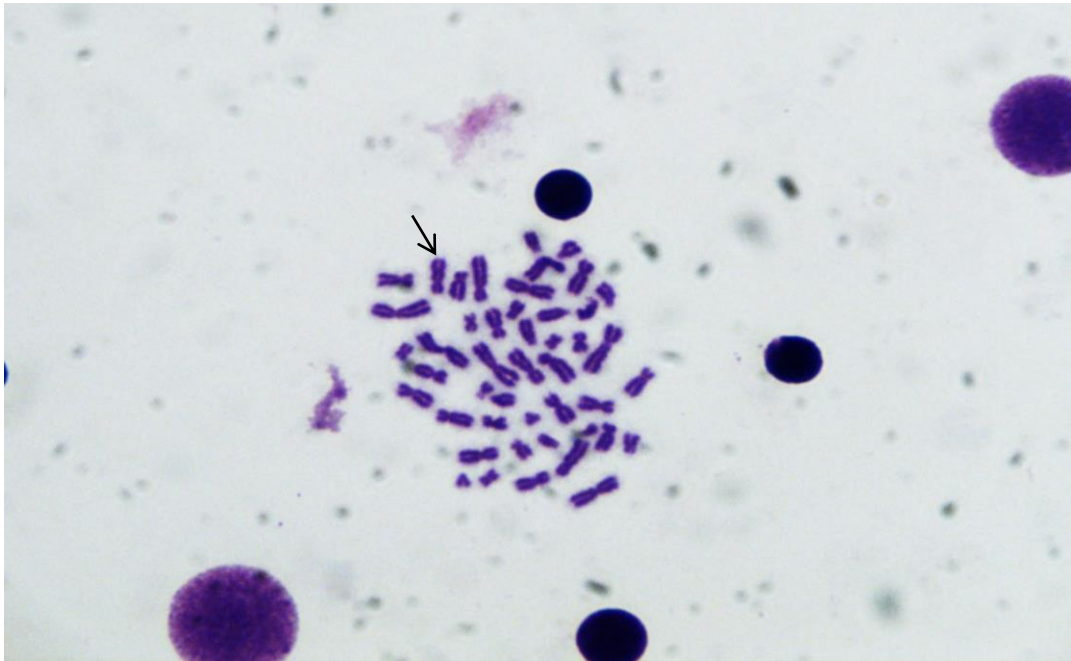


Şekil 3.35. Kromatid kırığı (1000x)

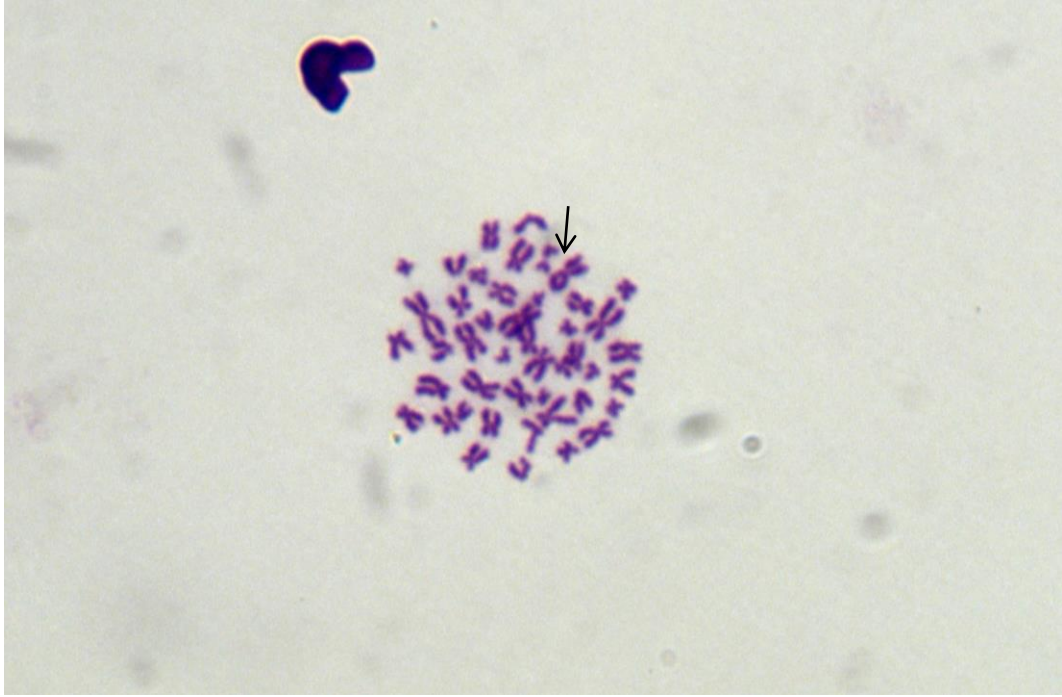




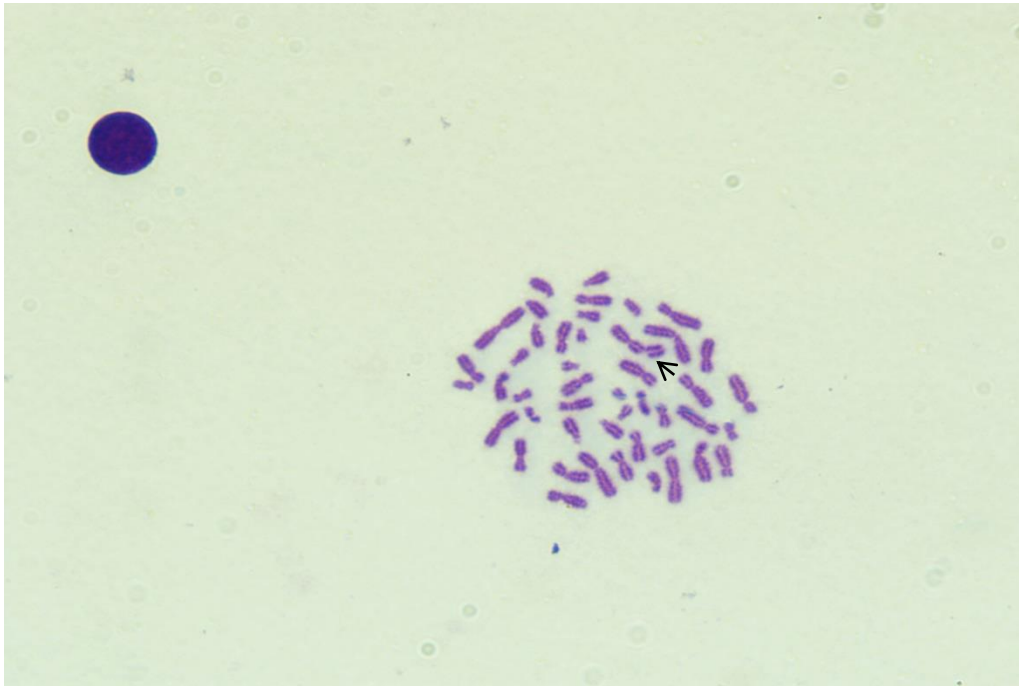
Şekil 3.36. Disentrik kromozom (1000x)



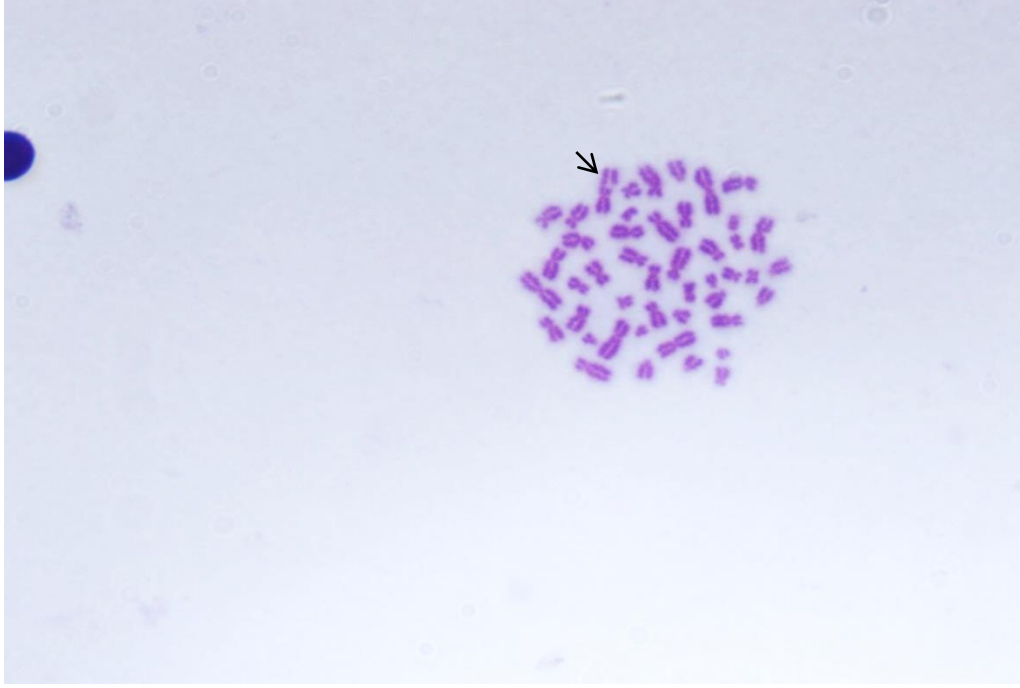
Şekil 3.37. Disentrik kromozom (1000x)



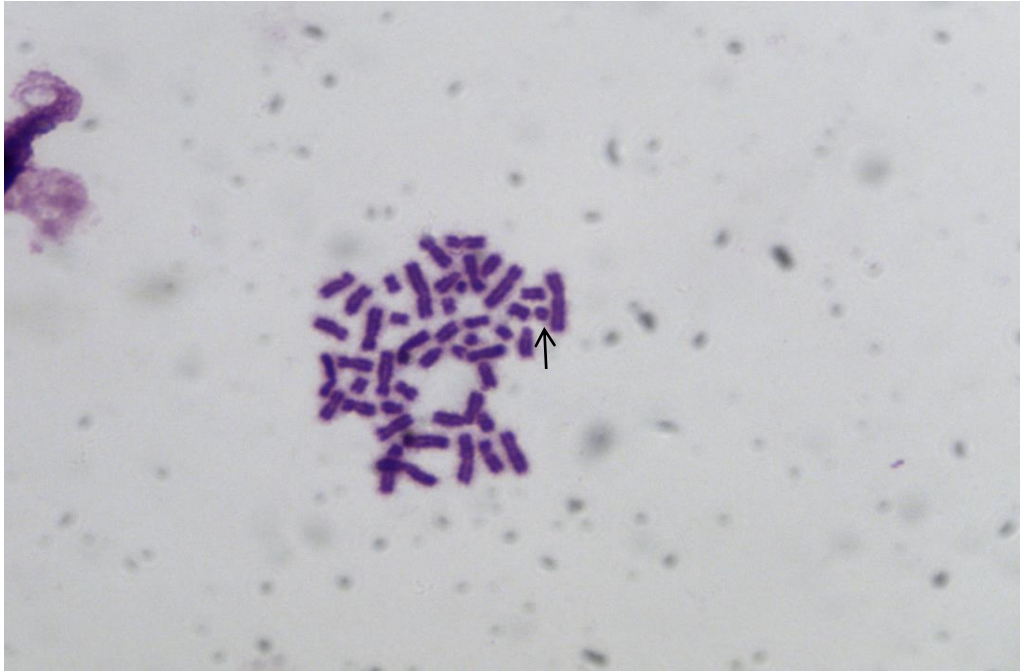
Şekil 3.38. Sister union (1000x)



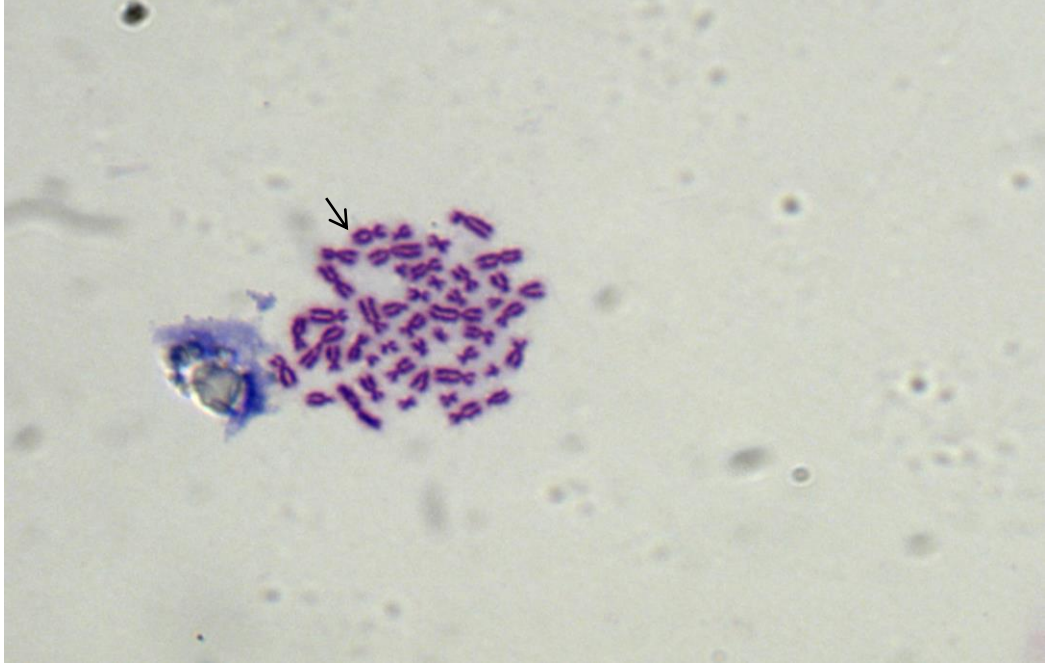
Şekil 3.39. Kromozom kırığı (1000x)



Şekil 3.40. Kromozom kırığı (1000x)



Şekil 3.41. Halka (ring) kromozom (1000x)



Şekil 3.42. Sister Union (1000x)

#### 3.4. Paraben ve Türevlerinin Kardeş Kromatid Değişimi (SCE) ve Replikasyon İndeksi (RI) Üzerine Etkileri

Yapılmış olan deneysel çalışmalardan elde edilen veriler olan hücre başına düşen SCE değerlerinin yüzdesi ve replikasyon indeksi değerlerinin istatistiksel sonuçları tüm maddelerin 24 ve 48 saatlik maruziyetleri ile birlikte çizelgeler ve şekiller halinde verilmiştir (Çizelge 15-21) (Şekil 3.43-3.60)

Sonuçları incelediğimizde; test maddelerinin 24 ve 48 saatlik sürelerde hücreler üzerinde replikasyon indeks değerlerinde doza ve süreye bağlı olarak anlamlı düşümlere sebep olduğu görülmektedir. Bu durum maddelerimizin hücre siklusunda sentez safhasında etki göstererek sitotoksik etkili olabileceklerini düşündürmektedir. Hücrelerde gözlenen toplam kardeş kromatid değişimlerinin anlamlılığını incelediğimizde; 24 saatlik maruziyette paraben'in 50 µg/ml'lik dozu, metil parabenin 100 ve 50 µg/ml'lik dozları, etil parabenin 25 µg/ml, izobutil parabenin ise en yüksek ve en düşük dozları olan 100 ve 10 µg/ml'lik dozlarında toplam SCE sayısında istatistiki bir anlamlılık olduğu görülmüştür. Propil, izopropil ve butil paraben ise kardeş kromatid değişim frekansı açısından anlamsız bulunmuştur. 48 saatlik maruziyette ise paraben dışındaki diğer

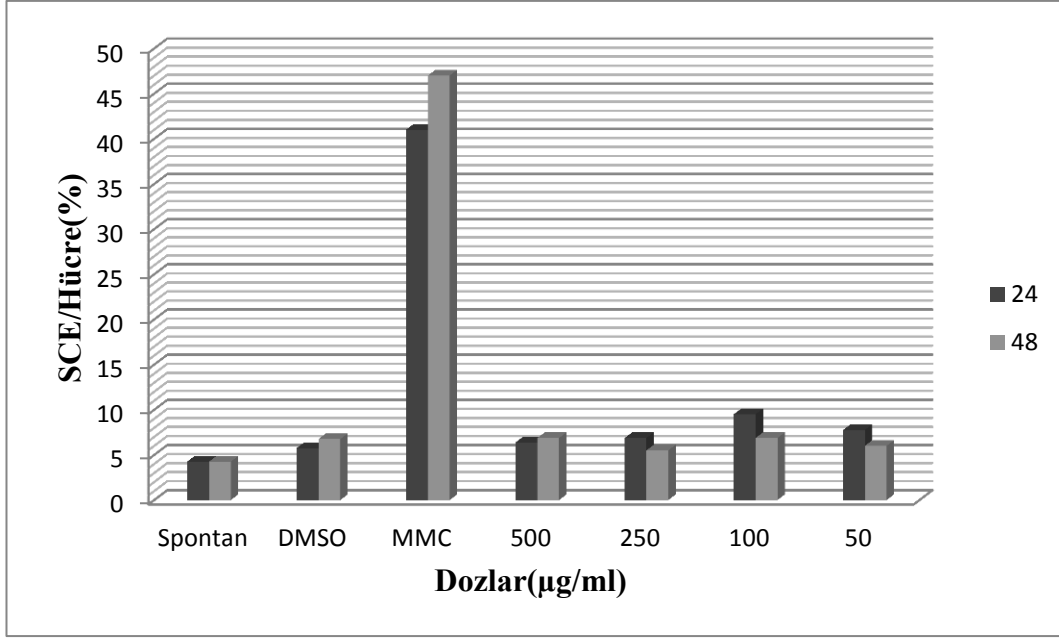
maddelerin farklı dozlarında anlamlı değerlere rastlanmıştır. Metil 25 µg/ml, etil 100, 50 µg/ml, propil 25 µg/ml, izopropil 100 µg/ml, butil 100, 50, 25 µg/ml ve izobutil parabende 100 µg/ml’lik dozda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

**Çizelge 3.15.** Parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

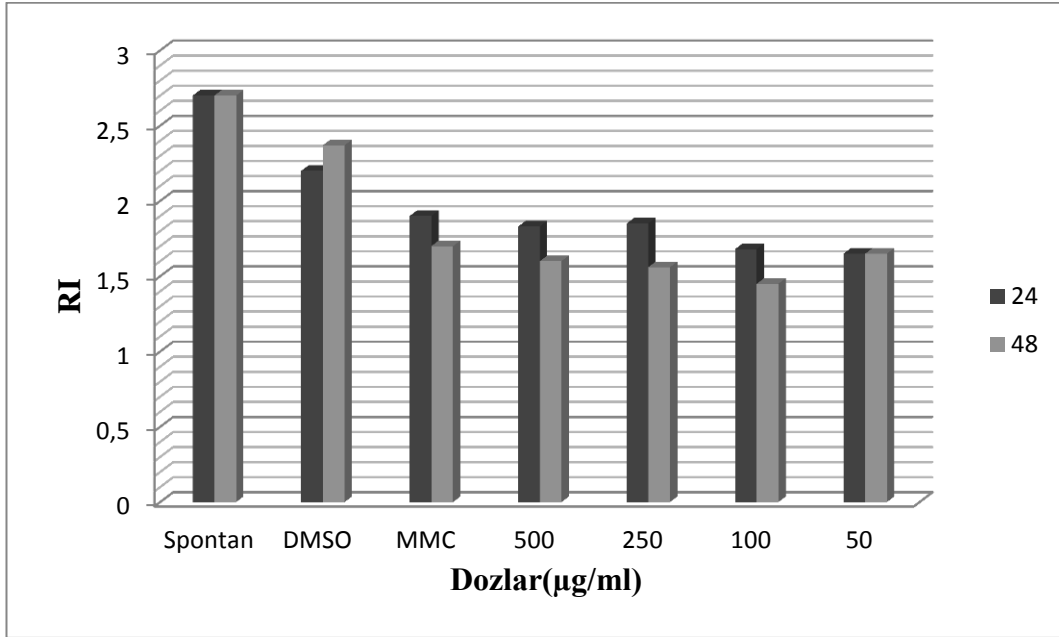
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD )
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
Paraben		50	50	7,75±0,70	1,65±0,14**
		100	50	9,50±2,47	1,68±0,50**
		250	50	6,87±3,71	1,85±0,07*
		500	50	6,37±0,88	1,83±0,09*
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
Paraben		50	50	6,00±1,06	1,65±0,07***
		100	50	6,87±3,00	1,45±0,07***
		250	50	5,50±0,00	1,56±0,00***
		500	50	6,87±0,88	1,60±0,14***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

Paraben SCE sayısında artışta herhangi bir etki göstermezken, replikasyon indeksindeki düşüşte kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlar vermekte, bu anlamlılık değeri 48 saatlik maruziyette daha yüksek olmaktadır (P≤0.001).



Şekil 3.43. Parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



Şekil 3.44. Parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi

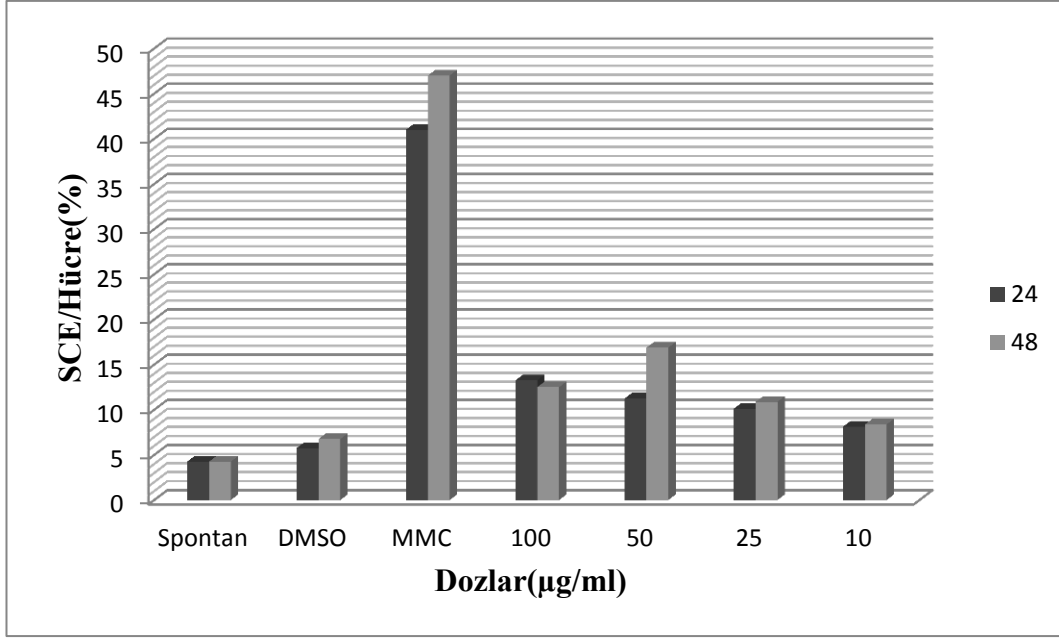
**Çizelge 3.16.** Metil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD)
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
Metil paraben		10	50	8,12±1,23	2,55±0,07
		25	50	10,12±3,71	2,11±0,01*
		50	50	11,25±0,70*	1,77±0,17**
		100	50	13,25±1,06**	1,82±0,17**
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
Metil paraben		10	50	8,37±0,53	2,31±0,09
		25	50	10,87±0,88	1,85±0,07**
		50	50	16,87±4,77**	1,65±0,07***
		100	50	12,50±2,12*	1,65±0,14***

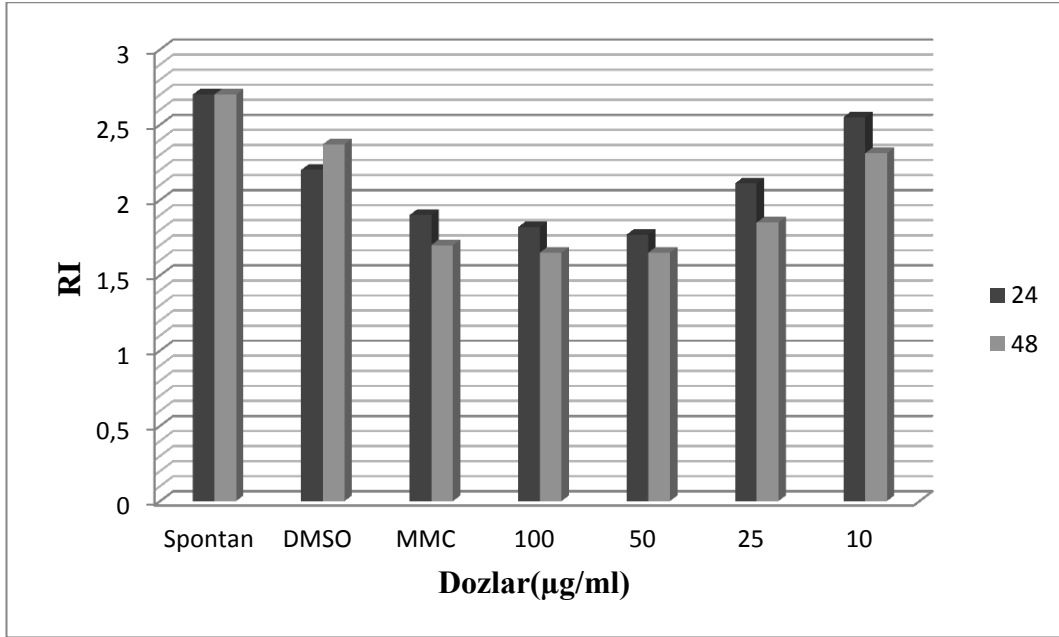
MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

Metil parabenin SCE sayısındaki artışı 24 ve 48 saatlik maruziyette en düşük doz dışında tüm dozlarda anlamlı şekilde arttırdığı görülmektedir. Replikasyon indeks değerleri ise 48 saatlik maruziyet süresinde daha yüksek anlamlılıkta olmak üzere her iki maruziyet süresinde de ilk üç dozda anlamlı bir şekilde düşmüştür.





Şekil 3.45. Metil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



Şekil 3.46. Metil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi

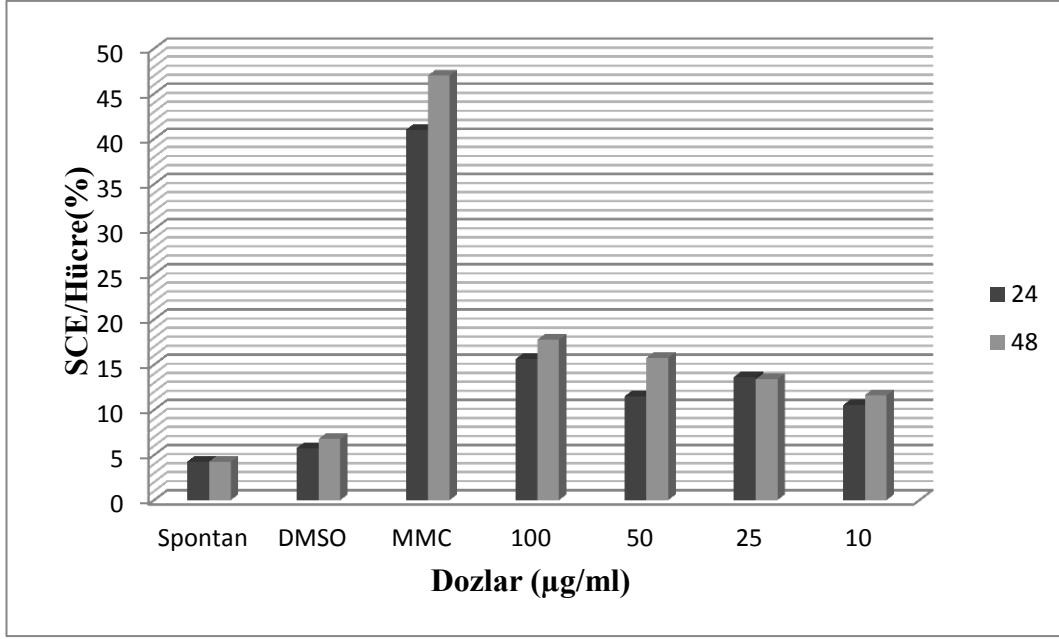


**Çizelge 3.17.** Etil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

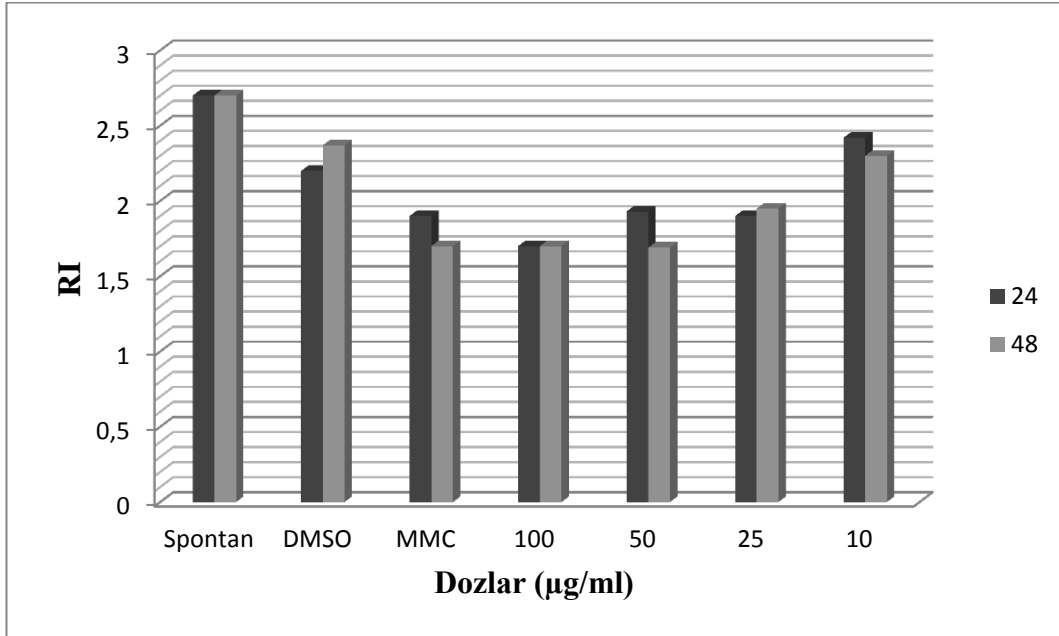
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD )
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
Etil paraben		10	50	10,50±2,12*	2,42±0,10*
		25	50	13,62±0,53**	1,90±0,14**
		50	50	11,50±2,47*	1,93±0,04**
		100	50	15,6±1,59**	1,70±0,07***
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
Etil paraben		10	50	11,62±1,59*	2,30±0,14
		25	50	13,37±2,65**	1,95±0,07**
		50	50	15,75±0,70**	1,69±0,07***
		100	50	17,75±0,35***	1,70±0,14***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

Etil paraben her iki maruziyet süresinde SCE frekansını metil parabene göre tüm dozlarda arttırmıştır. Replikasyon indeks değerlerinde ise anlamlı düşüşler görülmüştür.



Şekil 3.47. Etil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



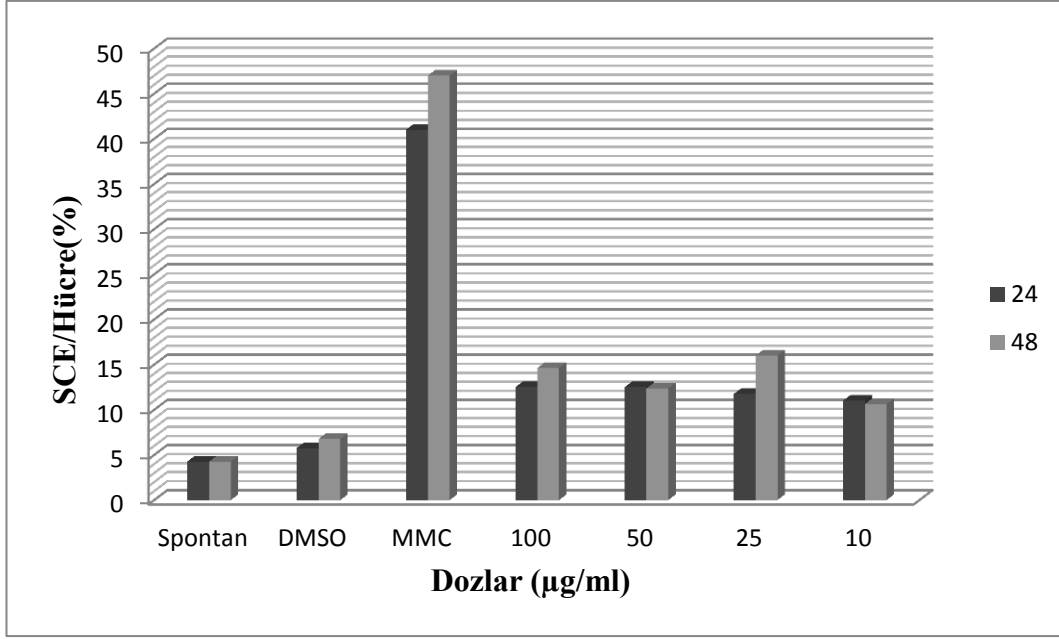
Şekil 3.48. Etil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi

**Çizelge 3.18.** Propil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

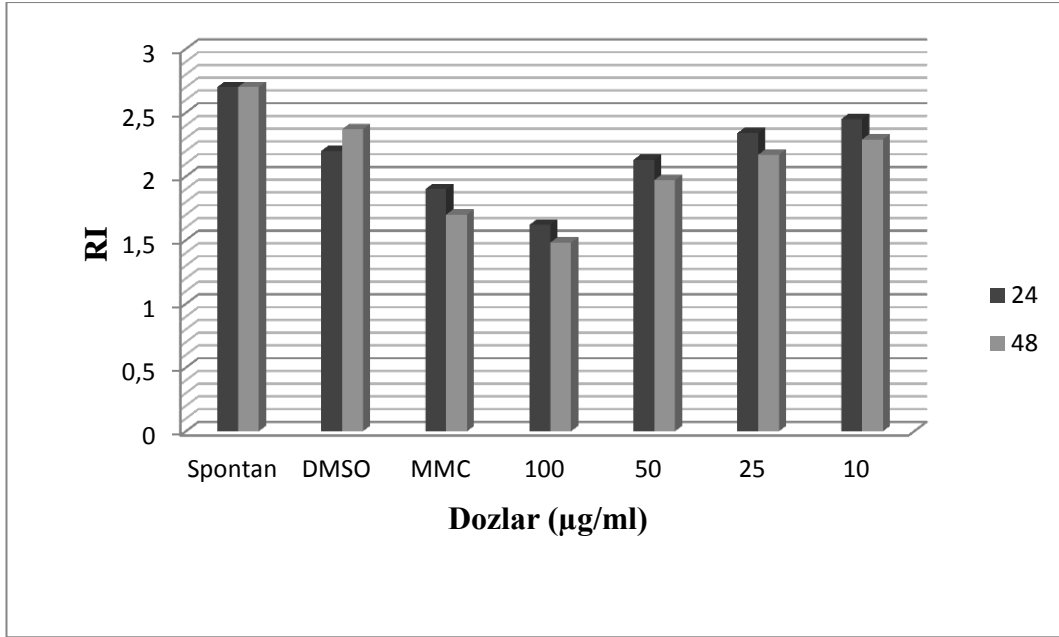
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD )
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
Propil paraben		10	50	11,0±1,06	2,45±0,07
		25	50	11,75±3,18	2,34±0,22
		50	50	12,50±3,18	2,13±0,32
		100	50	12,50±4,24	1,62±0,17**
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
Propil paraben		10	50	10,62±3,35	2,29±0,01
		25	50	16,0±1,06*	2,17±0,24
		50	50	12,37±4,77	1,97±0,31*
		100	50	14,62±5,48	1,48±0,25**

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P<0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

Propil paraben SCE sayısında anlamlı bir artışı 24 saatte göstermezken, 48 saatte sadece 25 µg/ml'lik dozda göstermiştir. Replikasyon indeksi değerleri ise 24 saatte en yüksek dozda, 48 saatte 100 ve 50 µg/ml'lik dozlarda düşüş göstermiştir.



Şekil 3.49. Propil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



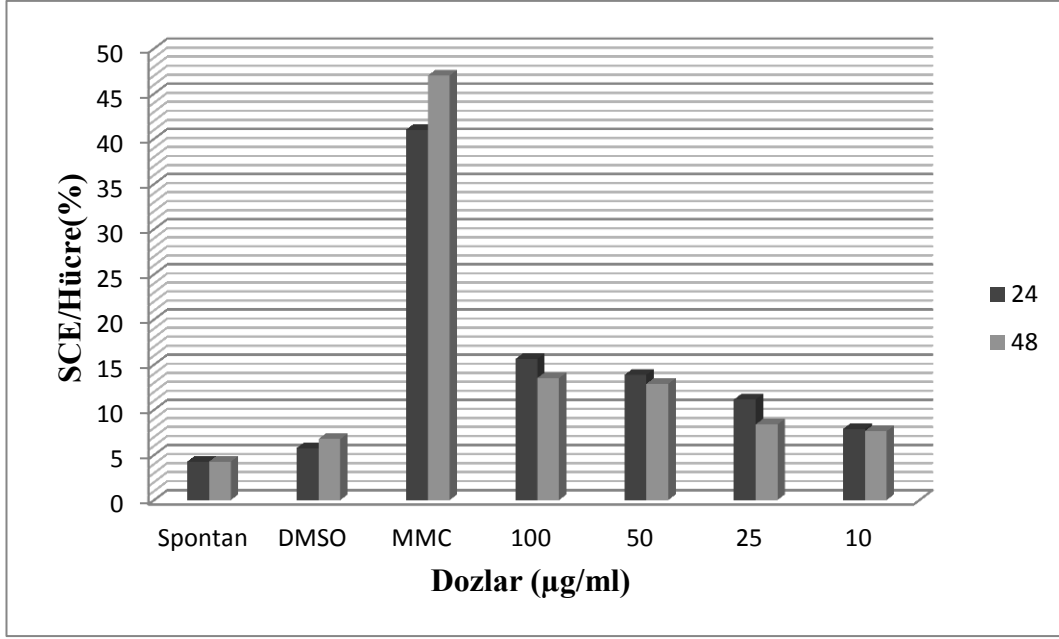
Şekil 3.50. Propil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi

**Çizelge 3.19.** İzopropil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

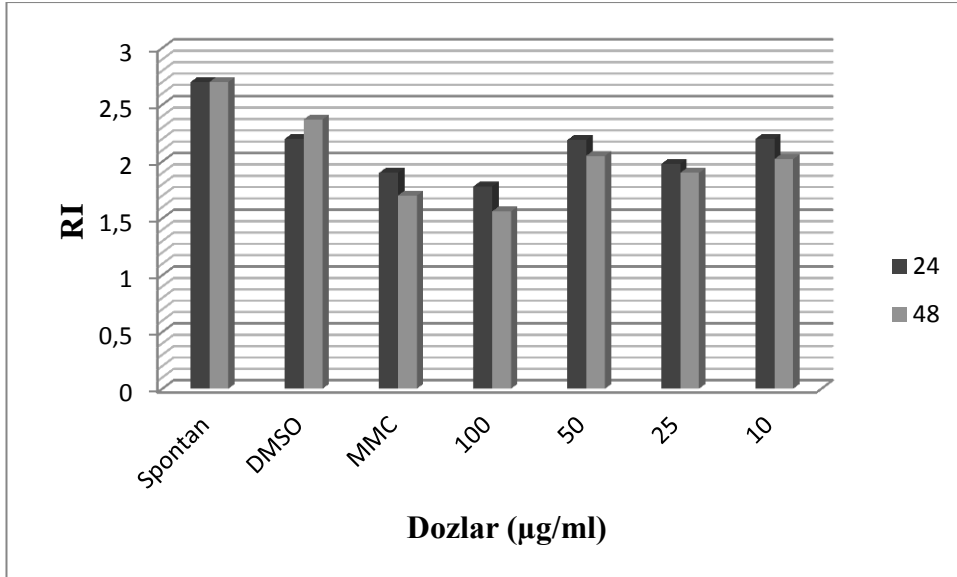
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD)
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
İzopropil paraben		10	50	7,87±2,65*	2,20±0,14
		25	50	11,12±3,35*	1,98±0,25
		50	50	13,87±0,88**	2,19±0,01
		100	50	15,62±1,59**	1,78±0,39*
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
İzopropil paraben		10	50	7,62±0,88	2,02±0,31*
		25	50	8,37±2,65	1,90±0,00**
		50	50	12,87±1,94**	2,05±0,07*
		100	50	13,50±0,35**	1,56±0,12**

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P<0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

İzopropil parabenin hücreler üzerinde gösterdiği sitotoksik etki 48 saatlik maruziyette anlamlılık gösterirken; kardeş kromatid değişimi üzerinde doz ve süreden bağımsız olarak farklı anlamlılıklar göstermektedir.



Şekil 3.51. İzopropil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



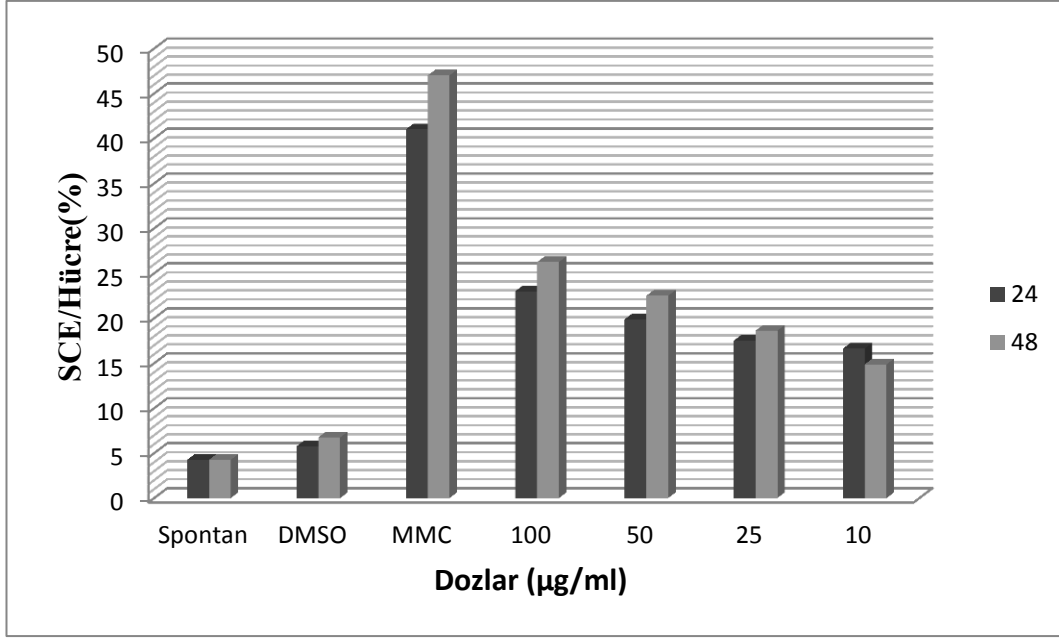
Şekil 3.52. İzopropil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi

**Çizelge 3.20.** Butil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

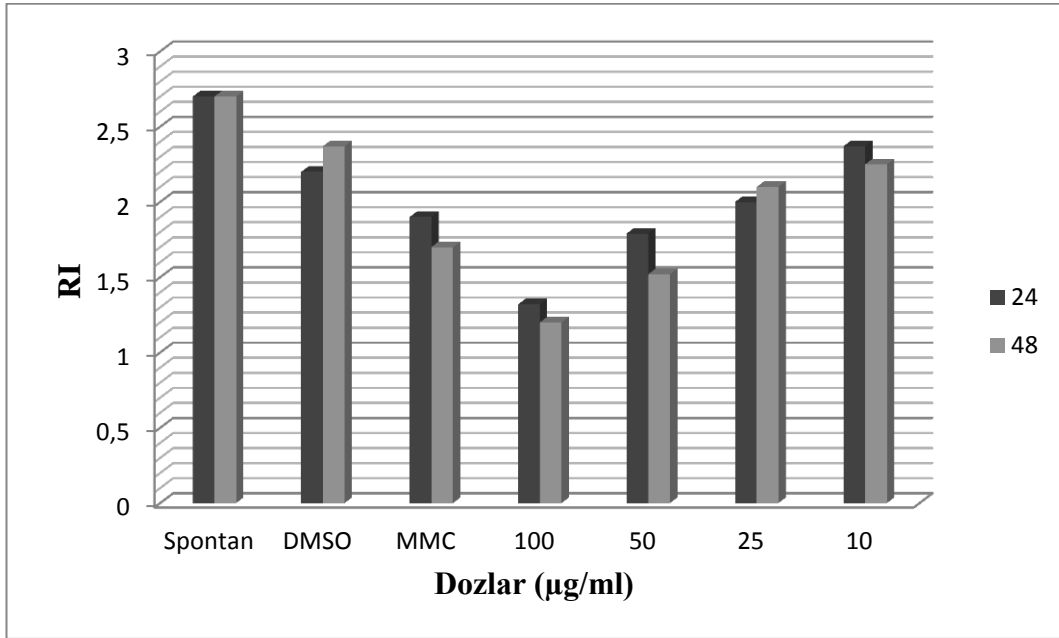
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD)
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
Butil paraben		10	50	16,62±2,65**	2,37±0,03
		25	50	17,50±3,18**	2,00±0,00
		50	50	19,87±2,65**	1,79±0,62*
		100	50	23,0±3,53***	1,32±0,10**
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
Butil paraben		10	50	14,87±1,94**	2,25±0,35
		25	50	18,62±0,53***	2,10±0,00
		50	50	22,50±0,35***	1,52±0,53**
		100	50	26,25±1,76***	1,20±0,00**

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

Butil parabenin SCE frekansı üzerindeki etkisinin diğer maddelere göre tüm doz ve sürelerde yüksek anlamlılıkta olduğu görülmektedir. Replikasyon indeksi üzerinde ise her iki maruziyet süresinde de sadece en yüksek iki dozda anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 3.53. Butil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



Şekil 3.54. Butil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi

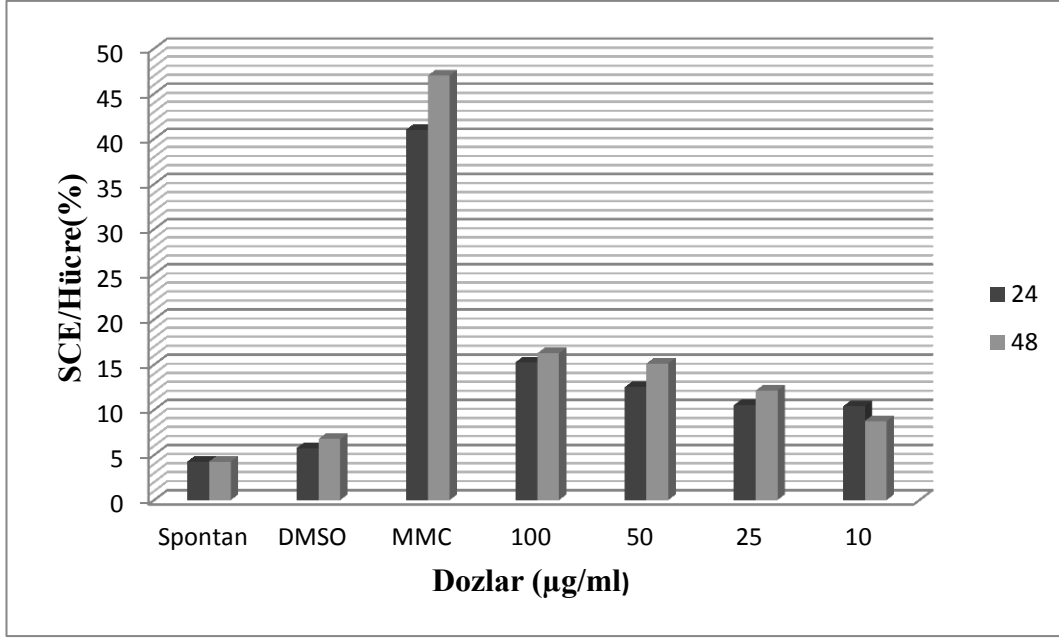


**Çizelge 3.21.** İzobutil parabenin 24 ve 48 saatlik maruziyette lenfosit hücreleri üzerinde hücre başına düşen SCE frekansı ve replikasyon indeksi değerlerine etkileri

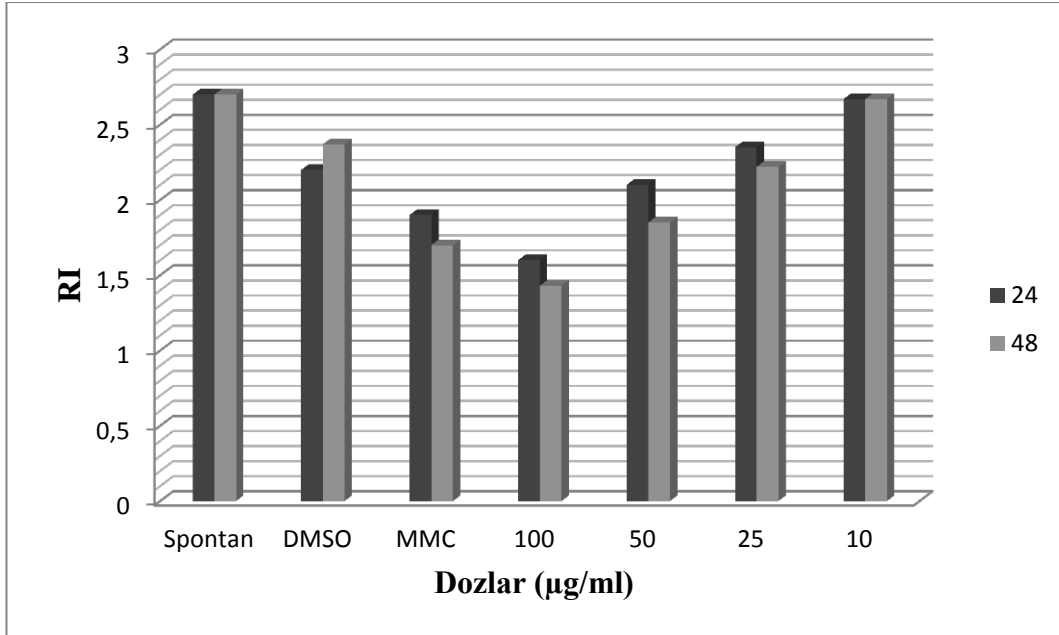
Madde	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Hücre Sayısı	SCE/Hücre±SD (%)	RI±SD (replikasyon indeksi±SD)
Spontan	24	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	5,75±0,35	2,20±0,07
MMC		0,3	50	41,0±2,82***	1,90±0,14*
İzobutil paraben		10	50	10,37±0,53*	2,67±0,03
		25	50	10,50±2,47*	2,35±0,00
		50	50	12,50±2,82**	2,10±0,07
		100	50	15,25±1,41**	1,60±0,14**
Spontan	48	-	50	4,25±0,35	2,70±0,28
DMSO		20µl	50	6,75±0,35	2,37±0,10
MMC		0,3	50	47,0±3,53***	1,70±0,07***
İzobutil paraben		10	50	8,75±0,35	2,67±0,17
		25	50	12,12±1,23**	2,22±0,03
		50	50	15,12±1,59***	1,85±0,14**
		100	50	16,25±1,41***	1,43±0,16***

MMC: Mitomisin-c(Pozitif Kontrol), DMSO: Dimetilsülfoksit (Negatif Kontrol), CBPI: Hücre Proliferasyon İndeksi ± SD: Standart Sapma Değerleri, \*, \*\*, \*\*\* P≤0,05; 0,01; 0,001 (Dunnett-t test)

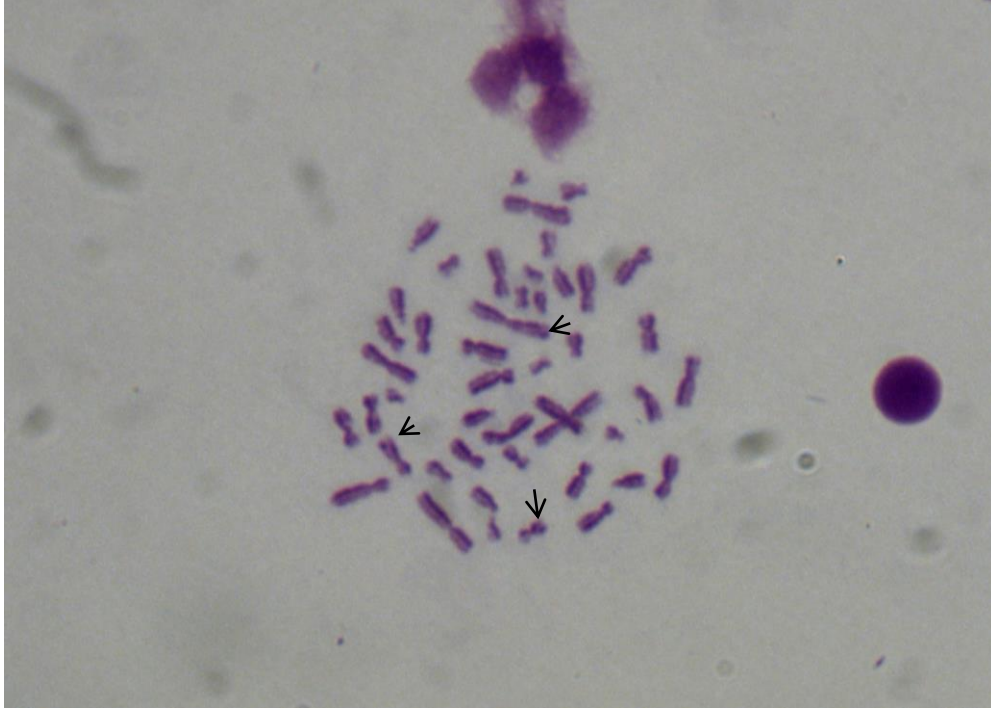
İzobutil paraben de doz ve süreye bağlı olarak SCE frekansında anlamlı artışlara sebep olurken, replikasyon indeks değerlerinde doz ve süreye bağlı olarak farklı anlamlılıkta sonuçlar vermiştir. Hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi doza ve süreye bağlı olmuştur.



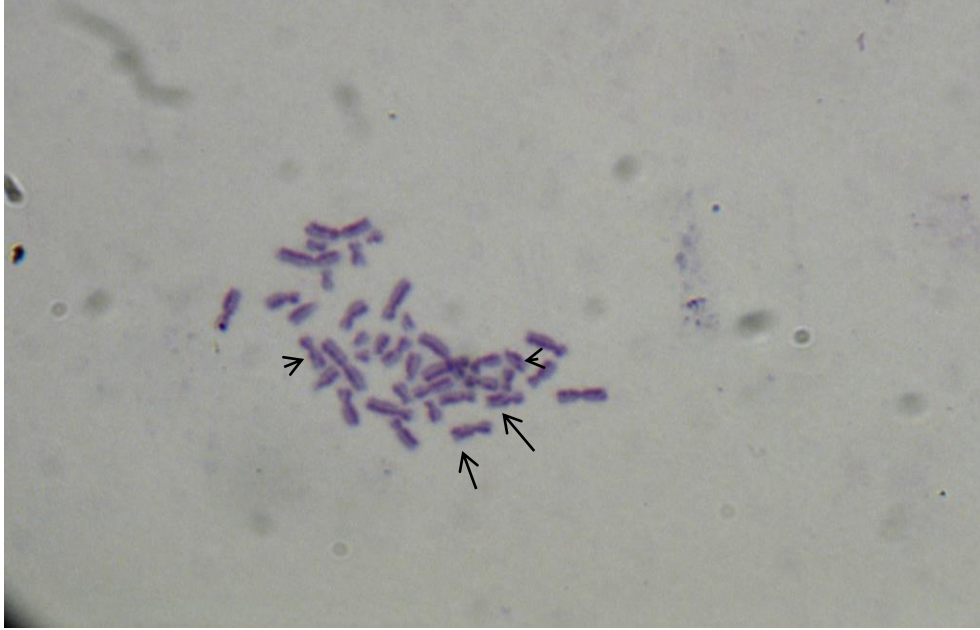
Şekil 3.55. İzobutil parabenin kardeş kromatid değişim frekansı üzerine etkisi



Şekil 3.56. İzobutil parabenin Replikasyon İndeks değeri üzerine etkisi



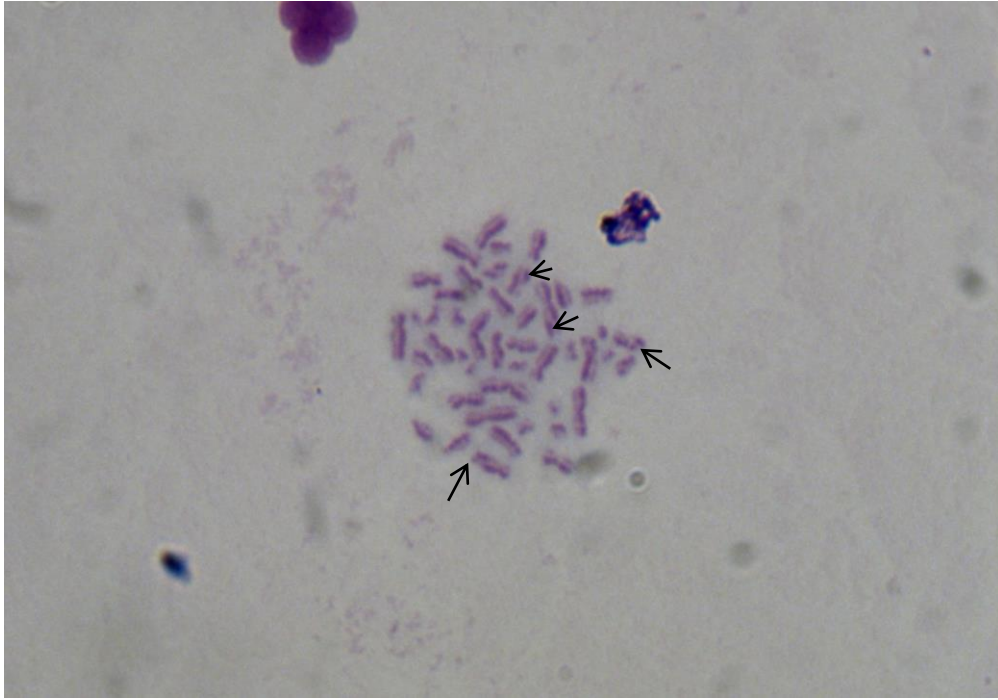
Şekil 3.57. Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x)



Şekil 3.58. Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x)



Şekil 3.59. Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x)



Şekil 3.60. Kardeş kromatid değişimleri gözlenen metafaz hücreleri (1000x)

#### 4. TARTIŞMA-SONUÇ

Günümüzde insanların günlük yaşamlarında ve çalışma koşullarında genotoksik ajanlara, mutajenik ve karsinojenik maddelere maruz kalmadan yaşamaları pek mümkün olmamaktadır. Gelişen teknoloji ile de birlikte üretilen ilaçlar, yeni kimyasal maddeler, gıda katkı maddeleri, tarımda kullanılan kimyasal bileşikler canlıların genetik yapısını etkileyici potansiyele sahiptirler. Bu potansiyel riskin araştırılmasında da çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Genetik materyalde oluşan hasarı kromozom düzeyinde tespit etmemizi sağlayan ve çok yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında, kimyasal maddelerin insan kan lenfositlerindeki etkilerini araştırmak için kullanılan kromozom aberasyonu (CA), kardeş kromatid değişimi (SCE) ve sitokinezi bloke edilmiş mikronükleus yöntemi (CBMN) gibi dünya genelinde kabul görmüş test sistemleri bulunmaktadır (Meng ve Zhang 1992).

Son yıllarda ilaç, gıda, kozmetik endüstrisinde kullanılan her kimyasalın insan sağlığı ve çevreye olan etkisi farklı test sistemleri ile ayrıntılı olarak incelenmekte, insan sağlığı ve çevre üzerinde kabul edilemez ölçüde risk taşıyanların kullanımına izin verilmemektedir (Beier 1990; Sarıkaya 2005).

Bu tez çalışmasında gıda, ilaç ve kozmetik sektörü gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılan bazı koruyucu katkı maddelerinin insanlarda herhangi bir genotoksik etkiye sahip olup olmadığının insan periferik lenfositlerinde kromozom anormalliklerini (CA), kardeş kromatid değişimini (SCE), iki nükleuslu hücrelerde mikronükleus oluşumunu (MN) artırıp artırmadığı araştırılarak anlaşılmaya çalışılmıştır.

Kullandığımız test maddelerinden paraben ve türevleriyle ilgili şimdiye kadar yapılmış çeşitli çalışmalar mevcut olup bu çalışmalar daha çok bu katkı maddelerinin östrojenik ve farklı hücre hatlarında sitotoksik potansiyelini belirlemeye yöneliktir. Örneğin, bir çalışmada bazı paraben kombinasyonlarının östrojenik etkisi MCF-7 hücreleri üzerinde östrojen reseptör bağımlı proliferasyon testi ile incelenmiştir. Sonuç olarak, parabenlerin ER'ye bağımlı östrojenik etkisinin olduğu ve bazı paraben kombinasyonlarının hücre içi sinyal yolağında gen ekspresyonunu etkileyebileceği rapor edilmiştir (Okuba ve ark. 2001).

Diğer bir çalışmada, propil parabenin, memeli hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkisi incelenmiştir. Hücre proliferasyonunda doza bağlı olarak azalmaya, sitotoksik olarak da DNA'da çift iplik kırıkları ve oksidatif hasara sebep olduğu rapor edilmiştir. Parabenlerin genotoksik etkisi üzerine memeli hücrelerinde daha fazla çalışma yapılmasının gerekli olduğu üzerinde durulmuştur (Martin ve ark. 2010).

Parabenlerin mutajenik etkisi ile ilgili bir çalışmada, Propil parabenin mutajenik etkisini incelemek için yapılan AMES testinde 10-2000 µg/plaka'lık dozda S9 varlığı ve yokluğunda bu katkı maddesinin nonmutajenik olduğu görülmüştür (McCann ve ark. 1975).

Propyl parabenin hepatosit hücrelerinde sitotoksik etkisi araştırılmış ve 0,2-2,0 mM dozlarda propyl parabenin hücrelerin ölümüne yol açtığı, sitotoksik etkili olduğu görülmüştür (Nakagawa ve Moldeus 1998).Yapılmış bir paraben çalışmasında (propyl) hela hücreleri ile yapılan sitotoksisite çalışmasında, 0,22 mM dozun IC50 değeri olduğu anlaşılmıştır ( Sheu ve ark. 1975).

Parabenlerin östrojenik aktivitesine bağlı olarak yapılmış olan bir çalışmada, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etki sonuçlarına göre;  $(1-2) \times 10^{-4}$  M konsantrasyonlarda bütül ve propil parabenin akciğer kanser hücrelerini öldürdüğü, etil ve metil parabenin ise sahip oldukları alkil grubuna bağlı olarak  $10^{-4}$  M konsantrasyonda bu hücreler üzerinde daha düşük toksik etki gösterdiği görülmüştür (Byford ve ark. 2002). Yapılmış olan bu çalışmada kullanılan dozlar ve sitotoksik etki düzeyi bizim çalışmamızda kullandığımız paraben ve türevlerinin etkilerini destekler niteliktedir, çünkü bizde de bütül parabenin en etkili madde olduğu yapmış olduğumuz testlerle belirlenmiştir.

Parabenlerin sıçanlarda yapılan bir çalışmada ise bir dizi östrojenik aktiviteye sahip oldukları Routledge ve ark. (1998) tarafından rapor edilmiştir.

Propil paraben ve bütül paraben ile yapılan çalışmalarda genç erkek sıçanlarda düşük epididim ve seminal vezikül ağırlığına, düşük sperm üretimi ve testosteron düzeyi gibi olumsuz üreme etkilerine bu maddelerin neden olabileceği belirtilmiştir (Oishi 2001, 2002).

17 paraben türevinin östrojenik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada parabenlerin çoğunun çin hamster ovaryum hücrelerinde (CHO-K1) östrojenik etkiyi indüklediği ve özellikle butil parabende fare karaciğer enzimlerinde önemli derecede azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. Ayrıca östrojenik aktivitenin de alkil gruplarıyla bağlantılı olduğu sonucuna varılmıştır (Watanabe ve ark. 2013).

Genel olarak katkı maddelerinin insanlar üzerindeki genotoksik, sitotoksik etkilerini incelemekte lenfosit hücreleri tercih edilmekte ve bu alanda da bizim de tez çalışmasında kullandığımız test yöntemleri uygulanmaktadır. Örneğin, yapılmış bir gıda katkısı çalışmasında bu maddenin uzun vadede insanlar üzerindeki genotoksik ve sitotoksik etkileri bizim de kullanmış olduğumuz 3 test sistemi ile incelenmiştir. Test sonuçlarına göre bu maddenin her üç test sisteminde de istatistiki olarak anlamlı artışa yol açtığı ve hücreler üzerinde genotoksik etkili olduğu görülmüştür (Yılmaz 2008).

Tez süreci boyunca yapılan deney sonuçlarını incelediğimizde paraben ve türevlerinin genel olarak tüm doz ve maruziyet sürelerinde CBMN testinde hücre proliferasyon indeksini düşürdüğü, CA testi sonuçlarına göre de mitotik indeks değerlerinde de doza da bağlı olarak istatistiki olarak anlamlı düşüşler olduğu belirlenmiştir. Bu açıdan bu katkı maddelerinin sitotoksik potansiyele sahip olduğu sonucuna varılabilmektedir.

CBMN testi hücre proliferasyon indeksi değerlerini incelediğimizde paraben ve türevlerinin, spontan ve negatif kontrol grubuyla karşılaştırıldığında lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik etkili olduğu, mikronukleus sayıları açısından değerlendirdiğimizde 24 saatlik maruziyette paraben ve türevlerinin özellikle yüksek dozlarda MN sayısında artışa yol açtığı, bu artışın 48 saatlik maruziyette daha da arttığı ve daha alt dozlarda da görüldüğü ve istatistiksel açıdan da değerlendirildiğinde bu sonuçların anlamlı çıktığı görülmektedir. Sonuç olarak paraben ve türevlerinin lenfosit hücreleri üzerinde doza ve süreye bağlı olarak genotoksik etkili olduğu sonucuna varabiliriz.

Farklı hücre kültürleri üzerinde yapılmış olan çalışmalar sitotoksik ve genotoksik etki açısından bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Örneğin, Parabenlerden propil parabenin bulunduğu bir çalışmada kullanılan doz aralıkları ve sitotoksik etkinin anlamlı çıktığı görülmüş ve bu çalışmanın da bizim çalışmamızı destekler nitelikte olduğu anlaşılmıştır. Çalışmada propil parabenin ve butillendirilmiş hidroksi anisol (BHA) denilen antioksidan katkı maddesinin maymun böbrek hücre hattındaki sitotoksik etkileri, DNA hasar potansiyeli, gen ekspresyon değişiklikleri araştırılmış ve bu iki katkı maddesinin de oksidatif strese bağlı olarak hücre döngüsünü engellediği ve DNA çift zincir kırıklarına yol açtığı görülmüştür. Özellikle birlikte kullanıldıklarında tek başına kullanımlarına göre çok daha yüksek sitotoksik etki gösterdikleri sonucuna varılmıştır (Martin ve ark. 2014). Bu çalışmada kullanılan dozlar 50, 200, 400 ve 500µM aralığında olup bizim kullandığımız dozlara yakındır ve sitotoksik etki açısından çalışmada kullandığımız doz aralığına paralellik göstermektedir.

Propyl parabenin hepatosit hücrelerinde sitotoksik etkisinin araştırıldığı bir başka çalışmada 0,2-2,0 mM (0,2 mM= 36,04 µg/ml'ye, 2 mM= 360,4 µg/ml) dozlarda propyl parabenin hücrelerin % 88'inin ölümüne yol açtığı, sitotoksik etkili olduğu görülmüştür. İzole edilmiş olan rat mitokondrilerine butil parabenin (0,05; 0,10 ve 0,25 mM [9,8; 19 ve 49 µg/ml]) dozları uygulandığında ise dördüncü basamak oksijen tüketim oranını artırdığı ve üçüncü basamak oksidasyon hızını ise inhibe ettiği görülmüştür (Nakagawa and Moldeus, 1998; Nakagawa ve ark., 1999). Bu çalışma her ne kadar lenfosit hücreleri üzerinde uygulanmış olmasa da sitotoksik etki açısından değerlendirildiğinde bizim çalışmamızı destekleyicidir. Özellikle butil parabenin kullandığımız dozlarda doza bağımlı olarak diğer maddelerden daha etkili olduğu sonucuna vardığımız düşünülürse bu çalışmada kullanılan dozlar da bizim çalışmamız ile benzer aralıklardadır.

İnsan lenfosit hücreleri ile yapılmış ve gıda katkı maddelerinin genotoksik ve sitotoksik etkilerinin araştırıldığı başka çalışmalar da literatürde bulunmaktadır. Örneğin gıdalarda renklendirici olarak kullanılan tartrazin, eritrozin ve amarant'ın insan lenfosit hücreleri üzerindeki genotoksik, sitotoksik ve sitostatik etkilerinin incelendiği bir çalışmada, amarant'ın ve eritrozin'in en yüksek dozda yüksek genotoksik, sitotoksik ve sitostatik etkilerinin olduğu görülürken, tartrazainin de farklı konsantrasyonlarda sitotoksik ve sitostatik etkiye



sahip iken herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında bu gıda renklendirici katkı maddelerinin lenfosit hücreleri üzerinde potansiyel toksik etkiye sahip oldukları sonucuna ulaşılmıştır (Mpountoukas ve ark. 2010). Bu çalışma da özellikle yüksek dozlarda paraben ve türevlerinde görülen sitotoksik ve genotoksik potansiyel açıdan değerlendirildiğinde bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir diyebiliriz.

Gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılan aspartam maddesiyle ilgili olarak Rencüzoğulları ve ark. (2004) 'nın yaptığı çalışmada, 500, 1000 ve 2000 µg/ml aspartam ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde aspartam'ın SCE oluşumunu indüklemeyen, hem CA hem de MN sayısını artırdığı ve sitotoksik bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Bu çalışma da bizim çalışmamıza benzer sonuçlara sahip olup, SCE'de etkili olup da CA' da etki göstermeyen ya da MN'de herhangi bir etki göstermeyen dozların CA'da etkili olduğu görülmüştür.

Hücre siklusunda metafaz evresindeki hücre yüzdesini veren MI' in azalması hücre siklusu ilerlemesinin inhibe edildiğini veya proliferatif kapasitedeki kaybı göstermektedir. Herhangi bir kimyasal veya fiziksel etkenin, hücre döngüsünün engellenmesi sebebiyle hücrenin mitozu geçememesi, ATP seviyesinin düşmesi ve enerji üretim merkezinin zorlanması, hücre döngüsüne özgü proteinlerin/enzimlerin inhibisyonu ile DNA sentezinin inhibisyonu veya iğ ipliklerinin oluşumlarının inhibisyonu şeklindeki, antimitotik aktivitesi sonucu mitotik indekste düşüşler gözlenebilir (Yüzbaşıoğlu ve ark. 2006).

Mitotik indeks değerleri karşılaştırıldığında paraben ve türevlerinin tüm dozlarda ve maruziyet sürelerinde metafaza giren hücre sayısını önemli oranda azaltarak lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini söyleyebiliriz. SCE testinde belirlenen hücre proliferasyon (replikasyon) indeks değerlerindeki düşüşler ile CA testi sonuçlarına göre belirlenen mitotik indeks değerlerindeki azalışlar istatistiksel olarak anlamlı olup maddelerin lenfosit hücreleri üzerinde önemli derecede sitotoksik etkili olduğuna işaret etmektedir. Bu açıdan her iki test sisteminde de maddeler sitotoksik etki açısından birbirlerini destekler niteliktedir.

Mitotik indeksin doz ve süreye bağılı olarak azaldığı ilaçlarla ilgili başka çalışmalar da mevcuttur. Viral enfeksiyonlar ve bazı tümörlerin tedavisinde kullanılan bir kanser ilacı olan gemcitamine, insan periferik lenfositlerinde tüm dozlarda mitotik indeksi anlamlı düzeyde düşürerek sitotoksik etki göstermiştir (Aydemir ve ark. 2005).

Bu tez çalışmasının genotoksik analiz kısmında kullanılan diğeri bir test olan kromozom aberasyon (CA) testi mutajen ve kanserojenlerin insanlar üzerindeki, genotoksik risklerini belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biridir. Kromozom aberasyonları DNA düzeyindeki zararın bir sonucu olarak ortaya çıkmakta ve CA'daki artış klastojenitenin bir göstergesi olup, bu durum bazı genetik hastalıkları ve kanser riskini artırmaktadır.

Paraben ve türevlerindeki kromozomal aberasyonları incelediğimizde genel olarak değerlendirildiğinde tüm test maddelerinin kromozomal aberasyonlarda artışa sebep olduğu ve en çok görülen aberasyonun kromatid kırıkları olduğunu söyleyebiliriz. Kromozom aberasyonlarında görülen bu artış maddelerin lenfosit hücreleri üzerinde klastojenik etkisinin bir sonucudur. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde yüksek konsantrasyonlardaki madde muamelesinin insan periferik kan kültüründe CA frekansını anlamlı olarak arttırabileceğini düşündürmektedir.

Lenfosit hücrelerinde mikronukleus oluşumu klastojenik veya aneujenik nedenli olabilmektedir. CA testinde kullanılan konsantrasyonlarda görülen klastojenik etki, MN testinde görülen MN sayısı ile bağlantılı olarak hem aneujenik hem de klastojenik etki testlerinin sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğuna işaret etmektedir.

Tez çalışmasında kullanılan diğeri bir yöntem de kardeş kromatid değişimi (SCE) olup, SCE çoğalan hücrelerde spontan olarak da meydana gelebildiği gibi, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların DNA'da meydana getirdiği, replikasyon sırasında onarılamayan hatalar sonucu da meydana gelebilmektedir. SCE sitogenetik çalışmalarda genotoksik ajanlara maruziyetin ve klastojenik etkinin bir göstergesi olarak bilinen çok hassas biyolojik bir indikatördür. Bir kimyasalın SCE frekansında artışa neden olması, onun replikasyon mekanizmasını

etkileyerek DNA hasarı oluşturabildiğinin göstergesidir. DNA'nın hasarına neden olan pek çok ajanın SCE sıklığını artırdığı bilinmektedir. Bu nedenle pek çok mutajen ya da karsinogen özelliğe sahip faktörlerin belirlenmesinde duyarlı bir parametre olarak kabul edilmektedir. İncelenen test maddelerinin DNA replikasyonu üzerindeki etkisi replikasyon indeksinin (RI) (Proliferasyon indeksi=PI) saptanması yoluyla bulunmuştur.

SCE testi sonuçlarımıza göre maddelerimiz replikasyon indeks değerlerini doza ve süreye bağlı olarak düşürmekte ve bu düşüşe bağlı olarak maddelerin replikasyon sürecini baskılayarak önemli derecede etki gösterdikleri görülmektedir. Hücre başına düşen SCE sayısında da paraben ve propil paraben dışında tüm paraben türevlerinde doza bağlı olarak önemli derecede artış görülmektedir. Çalışmamızda test ettiğimiz farklı konsantrasyonlardaki paraben ve türevleri tarafından indüklenen SCE frekansındaki anlamlı artış bu kimyasalların hücresel DNA replikasyonu ile etkileşime girdiğini ve DNA hasarına yol açtığını göstermektedir. Sonuç olarak hem SCE artışı hem de RI azalışı bu maddelerin sitotoksik ve genotoksik potansiyellerine işaret etmektedir. Test maddelerimizle ilgili lenfosit hücreleri üzerinde yapılmış bir çalışma bulunmamasıyla birlikte farklı katkı maddeleriyle ilgili SCE testi ile yapılmış çalışmalar ise literatürde mevcuttur.

Gıda katkı maddesi olarak kullanılan potasyum sorbatın genotoksik etkileri insan lenfosit hücre kültürü üzerinde (125, 250, 500 ve 1000 µg/ml'lik dozlarda) bizim çalıştığımız testlerden olan kromozom aberasyonu, kardeş kromatid değişimi, mikronukleus testi ile çalışılmıştır. Ayrıca DNA hasar tespiti comet testiyle de desteklenmiştir. Kromozom aberasyonlarının, kardeş kromatid değişimlerinin ve mikronukleus sayısındaki istatistiki olarak anlamlı şekilde artış gösterdiği görülmüş, comet testinde de tüm dozlarda DNA hasarı olduğu bildirilmiştir (Mamur ve ark. 2010). Bu çalışmadaki pozitif anlamlılık ve genotoksik etki, katkı maddeleriyle ilgili olarak birden fazla test sisteminin korelasyon göstermekte olduğuna işaret ederken, bizim çalışmamızda da kullanılan bu üç test yönteminin çalıştığımız katkı maddelerinin genotoksik ve sitotoksik potansiyellerinin belirlenmesinde birbirlerini destekleyici özellikte olması açısından önemlidir.

Testlerin sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde, kromozom anormalliklerindeki artışın, klastojenitenin bir göstergesi olup, bunun da genetik hastalıkları ve kanser riskini attırdığı; SCE frekansının yüksek sıklıkta olduğu hücrelerin saptanmasının, mutajenik ve karsinojenik ajanların klastojenik potansiyelinin belirlenmesinde hassas bir gösterge olduğu; mikronukleus testinin de genotoksik ya da genotoksik olmayan kimyasalları saptamada kullanılan bir metod olduğu dikkate alındığında tez süresi boyunca uygulanan tüm testlerde istatistiki olarak anlamlı sonuçların elde edilmiş olması kullandığımız test maddelerinin sağlıklı insan lenfosit hücreleri üzerinde sitotoksik ve genotoksik potansiyellerinin olduğunun göstergesidir. Bu sonuçlar neticesinde test edilen tüm maddelerin uzun süreli ve yoğun kullanımının insanlar üzerinde risk oluşturabileceğini düşünmekteyiz.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Ghaffar F., Semmler M., Al-Rasheid K., Klimpel S, Mehlhorn H. (2010), Comparative in vitro tests on the efficacy and safety of 13 anti-head-lice products, *Parasitol Res.*, **106**, 423–429.
- Abou-Eisha, A. ve Afifi, M. (2004), “Genotoxic evaluation of the antimalarial drug, fansidar, in cultured human lymphocytes”, *Cell Biology and Toxicology*, **20**, 303 -311.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, et al.(2000), IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res Rev*, **463**, 111-72.
- Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü. and Demirağ, K. (2000), Gıda katkı Maddeleri analiz yöntemleri. Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, 22, 1-244.
- Andrighetti-Frohner., C.R., Kratz, J. M., Antonio, R.V. CreczynskiPasa, T. B. , Barardi, C. R.M. ,Simoes, ,C.M.O.(2005), “In vitro testing for genotoxicity of violacein assessed by Comet and Micronucleus assays”, *Mutation Research*.
- Andersen, F.A. (2008), Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben, and benzylparaben as used in cosmetic products. *International Journal of Toxicology*, **27**, 1-82.
- Arslan, M., “Borik asitin insan periferik lenfositlerinde in vitro kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri”, (2004), Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1-62 .
- Atienzar, F.A., 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**, 76-102.

- Aydemir, N., Çeliker, S., Bilaloğlu, R. (2005), “In vitro genotoxic effects of the anticancer drug gemcitabine in human lymphocytes”, *Mutation Research*, 582:35-41.
- Beier, R.C. (1990), Natural Pesticides and bioactive components in foods, *Rev. Environ. Contam. Tox.*, **133**, 47-123.
- Benes D. M. and Burnett C. L. (2008), Final Report on the Safety Assessment of Pentasodium Pentetate and Pentetic Acid as Used in Cosmetics, *International Journal of Toxicology*, 27 (Suppl. 2):71–92.
- Biarati C, Goi G, Lombardo A, Tettamanti G. (1994), The esters of phydroxybenzoate (parabens) inhibit the release of lysosomal enzymes by mitogen-stimulated peripheral human lymphocytes in culture. *Clinica Chimica Acta*, **224**,147–157.
- Binelli A., Cogni D., Parolini M., Riva C., Provini A. (2009), “ *In vivo* experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes” *Aquatic Toxicology*, **91**, 238–244.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W. (2014), Review Parabens. From environmental studies to human health, *Environment International*, **67**, 27–42.
- Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L. Lando, C., Padovani, P., Sbrana, I., Vecchio, D., Puntoni, R. (1995), “Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans?”, *Cancer Genet. Cytogen.*,79 (2): 133-135.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Norppa, H., (2000), Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Research* 60 (6), 1619-1625.

- Boyacıoğlu, M.H. (2002), Bazı un katkı maddeleri ve bunlara ilişkin ÷lkemizdeki son gelişmeler. Gıda.Ekim, 65-68.
- 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 , **80-1**, 49-60 .
- Canımoğlu, S. ve Rencüzoğulları, E. (2006.), “The Cytogenetic effects of food sweetener maltitol in human peripheral lymphocytes”, Drug and Chemical Toxicology, **29**, 269–278.
- Carrano, A.V., Thompson, L.L., Lindi, P.A. and Minkler, J.L. (1978), Sister Chromatid Exchanges as an Indicator of Mutagenesis. Nature, **271**, 551-553.
- Ciniglia C., Cascone C., Giudice R.,Pinto G., Pollio A. (2005),” Application of methods for assessing the geno- and cytotoxicity of Triclosan to *C. Ehrenbergii*” Journal of Hazardous Materials 122 227–232)
- Çakmak G. (2000), “Trafik Polisi ve taksi sürüc÷leri hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferal lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-107.
- Çelik, M. (2003), “Dinocap fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insan periferal lenfositlerinde sitogenetik etkileri”, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-102.
- Darbre, P.D. (2003) Underarm cosmetics and breast cancer. J Appl Toxicol, 23, 89-95.
- 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, 5–13.
- Darbre P. D. and 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: 561–578.

- Demirel, S. ve Zamani, A. G. (2002), Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları, Genel Tıp Derg. 12(3), 123-127.
- Decordier, I. ve Kirsch-Volders, M. (2006), “The in vitro micronucleus test: From past to future”, Mutation research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 1, 607.
- Dhawan, A., Kayani, M.A., Parry, J. M., Parry, E. ve Anderson, D. (2003), “Aneugenic and clastogenic effects of doxorubicin in human lymphocytes”, Mutagenesis, **18**, 487-490.
- Ergene, S., Çelik, A., Çavaş, T. ve Kaya, F. (2007), “Genotoxic biomonitoring study of population residing in pesticide contaminated regions in Göksu Delta: Micronucleus, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges”, Environment International, **33**, 877–885.
- Fairbairn D. W., Olive P. L., O’neill K. L. (1995), “The Comet Assay a Comprehensive Review”. Mutation Research,(339): 37-59.
- Fang, J.L., Stingley, R.L., Beland, F.A., Harrouk, W., Lumpkins, D.L., Howard, P.( 2010), Occurrence, efficacy, metabolism, and toxicity of triclosan. J. Environ. Sci. Health. C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 28, 147–171.
- FDA, 2013, Inactive Ingredient Search For Approved Drug Products. Available <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.Cfm>. last updated 23 Oct 2013. Accessed 24 Oct 2013.
- Fenech, M. and Morley, A.A. (1985), Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research, 147 (1-2), 29-36.
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E. and Bonassi, S., 1999. The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on the Use of the Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. Mutation Res., 428: 271-283.
- Fenech M. (2000), “The *in vitro* micronucleus technique”, *Mutat. Res.*, 455 (1-2): 81-95.
- Fenech, M. (2002), “Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology”. Toxicology, 181 -182, 411 -416.



- Fenech M., Bonassi S., Turner J., et al. (2003), "HUMAN MicroNucleus project. Intra and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN Project" *Mutation Research*, 534, 45–64.
- Fenech M., (2006). "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death", *Mutat. Res.*, 600: 58- 66
- Guo, L-W., Wu, Q., Green, B., Nolen, G., Shi, L., Surdo, J.L., Deng, H., Bauer, S., Fang, J-L., Ning, B. (2012), Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 262, 117–123.
- Gateva, S., Jovtchev, G., Stergios, M. (2013), Cytotoxic and clastogenic activity of CdCl<sub>2</sub> in human lymphocytes from different donors, *Environmental toxicology and pharmacology*, **36**, 223-230.
- Gorla, N., Ovando, G. H., Larripa, I. (1999), "Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin", *Toxicology Letters*, 104 :43–48.
- Guo, L-W., Wu, Q., Green, B., Nolen, G., Shi, L., Surdo, J.L., Deng, H., Bauer, S., Fang, J-L., Ning, B. (2012), Cytotoxicity and inhibitory effects of low-concentration triclosan on adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Toxicology and Applied Pharmacology* 262, 117–123.
- Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, et al. (1994), Cancer risk in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, 54(11):2919-2922.
- Hagmar, L., Bonassi, S., Strömberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Noppa, H., Reuterwall, C. (1998), Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European study group on cytogenetic biomarkers and health (ESCH). *Cancer Res.*, 58:4117-4121.

- Hagmar, L., Stromberg, U., Tinnerberg, H., Mikoczy, Z. (2001), The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *International Journal of Hygiene and Environmental Health.*, **204**,43 -47.
- Heidemann A. (1990), Chromosome aberration assay in Chinese Hamster V79 cells in vitro with FAT 80'023/Q. Cytotest Cell Research. CCR project no. 179100. December 27.
- Helleday, T. (2003), Pathways for Mitotic Homologous Recombination in Mammalian Cells. *Mutation Res.*, **532**, 103-115.
- İkbal, M., Doğan, H., Odabaş, H., Pirim, İ. (2004), Genotoxic Evaluation of the Antibacterial Drug, Ciprofloxacin, in cultured Lymphocytes of Patiens with Urinary Tract Infecftion. *Türk J Med Sci.*, 34, 309-313.
- Ishiwatari S, Suzuki T, Hitomi T, Yoshino T, Matsukuma S, Tsuji T, et al.(2007), Effects of methyl paraben on skin keratinocytes. *J Appl Toxicol*, **27**, 1–9.
- Istifli E.S, Topaktaş, M. (2015) ), In vitro genotoxicity and cytotoxicity of a particular combination of pemetrexed and cefixime in human peripheral blood lymphocytes, *SpringerPlus* 4:35 DOI 10.1186/s40064-015-0803-3
- Jones R. D., Jampani H. B., Newman J. L., Lee A. S. (2000), Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings, *AJIC Am J Infect Control* :28: 184-96.
- Kaderlik R. K., Lin D. X., Long, N. P. (1992). Advantages and Limitation of Laboratory Methots for Measurement of Carcinogen DNA Adducuts for Epilological Studies, *Toxicol. Let.*, 64: 469-475.
- Kaya, F.F. ve Topaktaş, M. (2007),“Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro”, *Mutat. Res.*,626: 48-52 .
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardemac, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, JR.M., Kirchner, S., Lorge, E., Morita, T., Norppa, H., Surrales, J., Vanhauwaert, A. and Wakata, A., 2003. Report from the in vitro Micronucleus Assay Working group. *Mutation Res.* 540: 153–163.

- Kolšek, K., Gobec, M., Raščan, I.M., Dolenc, M.S. (2015), Screening of bisphenol A, triclosan and paraben analogues as modulators of the glucocorticoid and androgen receptor activities, *Toxicology in Vitro* 29, 8–15.
- Lemini, C., Jaimez, R., Avila, M.E., Franco, Y., Larrea, F., Lemus, A.E., 2003. In vivo and in vitro estrogen bioactivities of alkyl parabens. *Toxicology and Industrial Health* 19, 69–79.
- Lin W., Huang Y-W., Zhou X-D., Ma Y. (2006), In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **217** , 252–259.
- Loretz L. J., Api A.M., Barraja L.M., Burdick J., Dressler W.E., Gettings S.D., Hsu H. H., Pan Y. H. L., Re T.A., Renskers K.J., Rothenstein A., Scrafford C.G., Sewall C. (2005), Exposure data for cosmetic products: lipstick, body lotion, and face cream, *Food and Chemical Toxicology*, **43**, 279–291.
- Official Journal of the European Union. Regulation (EC) no 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products. 2009;L 342:59–209.
- Ma, H., Zheng, L., Li, Y., Pan, S., Hu, J., Yu, Z., Zhang, G., Sheng, G., Fu, J., (2013), Triclosan reduces the levels of global DNA methylation in HepG2 cells, *Chemosphere* 90, 1023–1029.
- Mamur S., Yuzbasioğlu D., Ünal F. ve Yılmaz S. (2010), Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes? *Toxicology in Vitro* , 24, 790–794.
- 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.
- Martín, J.M.P., Freire, P.F., Daimiel, L., Botas, J.M., Sánchez, C.M. Lasunción, M.A., Peropadre, A., Hazen, M.J. (2014), The antioxidant butylated hydroxyanisole potentiates the toxic effects of propylparaben in

- cultured mammalian cells, *Food and Chemical Toxicology* 72, 195–203.
- Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M. (2006), Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring, *Biochimie*, **88**, 1515–1531.
- McCann J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. (1975), Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *PNAS* 72, 5135–5139.
- Meng Z. and Zhang L. (1992), Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite, *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 298,2, 63-69.
- 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.
- Mpountoukas P., Pantazaki A., Kostareli E., Christodoulou P., Kareli D., Poliliou S., Mourelatos C., Lambropoulou V., Lialiaris T. (2010), Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine, *Food and Chemical Toxicology* 48 , 2934–2944
- Nakagawa, Y., and Moldeus, P. (1998), Mechanism of p-hydroxybenzoate ester-induced mitochondrial dysfunction and cytotoxicity in isolated rat hepatocytes. *Biochem Pharmacol*, **55**, 1907-14.
- Nakagawa, Y., Tayama, S., Suzuki, T., and Sasaki, M. (1999), p-Hydroxybenzoate alkyl esters cause cytotoxicity via mitochondrial dysfunction in isolated rat hepatocytes. *Tokyo Toritsu Eisei Kenkyusho Kenkyu Nenpo*, 49:297-301. Abstract from TOXCENTER 1999:141047.
- Natarajan, A.T. (2002), Chromosome aberrations: past, present and future. *Mutation Research*, 504, 3-16.
- Nesslany, F., Brugier, S., Mouriès, M., Curieux, F., Marzin, D. (2004), “ In vitro and in vivo chromosomal aberrations induced by megazol”, *Mutation Research*, 560:147–158 .

- Norppa, H., Falck, G.C-M., (2003), What Do Human Micronuclei Contain? *Mutagenesis*,18 (3), 221-233.
- Núñez L, Tadeo JL, García-Valcárcel AI, Turiel E. (2008), Determination of parabens in environmental solid samples by ultrasonic-assisted extraction and liquid chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*,1214:17882.<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.105>.
- Oishi, S., (2001), Effects of butylparaben on the male reproductive system in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 17, 31-39.
- Oishi, S., (2002), Effects of propylparaben on the male reproductive system. *Food and Chemical Toxicology*. 40, 1807-1813.
- Okubo T., Yokoyama Y., Kano K., Kano I., (2001), ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER $\alpha$  and PR, *Food and Chemical Toxicology* 39 , 1225–1232
- Oliveira F., Speare R., Heukelbach J., (2006), High *in vitro* efficacy of Nyda® L, a pediculicide containing dimeticone, *JEADV* ISSN 1468-3083.
- Parlak, Ş. (2007), Gıda koruyucu maddesi olan bifenil'in insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimi, kromozom anormalliği ve mikronükleus oluşumu üzerine etkileri. Y. Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Perry P, Wolff S. (1974), New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*. 13;251(5471):156-8.
- Polati S., Gosetti F. And Gennaro M. C. (2007), Preservatives in Cosmetics. *Analytical Methods, Analysis of Cosmetic Products*.
- Pouillot A, Polla BS, Polla, AS. (2006), Conservateurs en cosmetology mise au point sur les parabenes. *J Méd Esthét Chir Dermatol*, **33**, 187–90.

- Rencüzoğulları, E., Tüylü, B.A., Topaktaş, M., İla, H.B., Karayıldız, A., Arslan, M. ve Diler, S.B. (2004), Genotoxicity of aspartame. *Drug Chem. Toxicol*, **27**, 257-268.
- Renwiek, A.G. (1995), The Use of an Additional Safety or Uncertainty Factor for Nature of Toxicity in the Estimation of Acceptable Daily Intake and Tolerable Daily Intake Values, *Regulatory Toxicotry and Pharmacology*, **22**, 250.
- Rodricks J. V., Swenberg J. A., Borzelleca J. F., Maronpot R. R. and Shipp A. M., (2010), REVIEW ARTICLE Triclosan: A critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products, *Critical Reviews in Toxicology* ; 40(5): 422–484.
- Routledge, E.J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J. and Sumpter, J., (1998), Some alkyl hydroxyl benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **153**, 12-19.
- Ros-Llor, I. ve Lopez-Jornet, P. (2014), Cytogenetic analysis of oral mucosa cells, induced by chlorhexidine, essential oils in ethanolic solution and triclosan mouthwashes, *Environmental Research*, **132**, 140–145.
- Saldamlı, İ. Ve Uygun, Ü. (2005), “Gıda Kimyası/Gıda Katkı Maddeleri”, Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları, Ankara, 533-547 .
- Sarıkaya, R. (2005), “Sodyum Nitrit, Sodyum Nitrat, Potasyum Nitrit ve Potasyum Nitrat’ın Genotoksik Etkisinin Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Araştırılması” Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-110.
- SCCS, Scientific Committee on Consumer Safety. Clarification on opinion SCCS/1348/10 in the light of the Danish clause of safeguard banning the use of parabens in cosmetic products intended for children under three years of age; 2011. p. 1–51.
- Sarıkaya, R. ve Solak, K. (2003), “Benzoik Asit’in *Drosophila melanogaster*’de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması”, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, **23**, 19-32.

- Sasaki, F.Y., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S. (2002), The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research* **519**, 103–119.
- Sebastià, N., Soriano, J.M., Barquiner, J.F., Villaescusa, J.I., Almonacid, M., Cervera, J., Such, E., Silla, M. A., Montoro, A. (2012), In vitro cytogenetic and genotoxic effects of curcumin on human peripheral blood lymphocytes, *Food and Chemical Toxicology*, **50**, 3229–3233,
- Sebastià, N., Almonacid, M., Villaescusa, J.I., Cervera, J., Such, E., Silla, M.A., Soriano, J.M., Montoro, A. (2013), Radioprotective activity and cytogenetic effect of resveratrol in human lymphocytes: An in vitro evaluation, *Food and Chemical Toxicology*, **51**, 391–395.
- Sheu C.W., Salomon, D., Simmons, J.L., Sreevalsan, T. (1975), Inhibitory effects of lipophilic acids and related compounds on bacteria and mammalian cells. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **7**, 349–363.
- Siviková, K., Dianovský, J., Holečková, B., Galdíková, M., Kolesárová, V. (2013), Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide., *Chemosphere* Jul 28;92(5):555-62.
- Snyder, R. D. ve Gren, J. W. (2001), A review, genotoxicity of marketed pharmaceuticals, *Mutat. Res., Rev. Mutat. Res.*, **488**, 151-169.
- 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**, 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**, 985–1015.
- Surrallés J., Xamena N., Creus A. and Marcos R., (1995), The suitability of the Micronucleus Assay in Human Lymphocytes as a New Biomarker of Excision Repair. *Mutation Res.*, 342: 43-59.

- Tayama S., Nakagawa Y., Tayama K. (2008), Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells, *Mutation Research* ,649, 114–125.
- Taylor, J.H. (1958),“Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes” *Genetics*,43: 515–529.
- Terasaki, M. Takemura Y, Makino M. (2012), Paraben-chlorinated derivatives in river waters.*Environ Chem Lett*, **10**, 401–6.
- Topaktaş, M. ve Rencüzoğulları, E. (1995), Sitogenetik, Ç.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi, 182s.
- Topaktaş, M. ve Speit, G. (1990), SisterChromatid Exchange (SCE) Testinin Mutajenite ve Kanserojenitenin Belirlenmesinde Kullanılması. Ç.Ü. Sağlık Bil. Der., 5(1,2,3), 73-84.
- Ulupınar, M., Okumuş, M. ve Okumuş, İ. (2002), “Detection of Mutagenic-Carcinogenic Pollutants in Aquatic Systems Using Cytogenetic Methods in Fish”, *Turkish Journal of Zoology*, **26**, 141-148.
- Üstündağ, A. (2004), Kurşun genotoksisitesinde delta -aminolevülinik asitin etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniv, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Watanabe, Y., Kojima,H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Ohta, S., Kitamura, S., (2013), Comparative study on transcriptional activity of 17 parabens mediated by estrogen receptoraandband androgen receptor, *Food and Chemical Toxicology*, **57**, 227–234.
- Wielogórska, E., Elliott, C.T., Danaher, M., Connolly, L. (2015), Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants, *Toxicology in Vitro* **29**, 211–220.
- Wilcosky, T. C., & Rynard, S. M. (1990), Sister chromatid exchanges. *Hulka BS, Wilcosky, TC. Griffith JD, eds. Biological Markers in Epidemiology*, **1**, 103-122.
- Wilma, F. B., Donald, V. B., James G. M., and F. A.A. (2005), Safety of ingredients used in cosmetics, *J Am Acad Dermatol*, **52**, 125-32.



- Wulf, H.C. (1989), Monitoring of genotoxic exposure of humans by the sister chromatid exchange test. Methodology and confounding factors. Danish Medical Bulletin. 37(2):132 -143.
- Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., Yılmaz S., Ünal F., Aksoy H., (2006), “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, *Mutat. Res.* 604 (1-2): 53-59
- Yılmaz S.(2008), Bazı gıda katkı maddelerinin genotoksik etkileri,Doktora tezi,Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Zhang, Z., Che,W., Liang, Y., Wu, M., Li, N., Shu, Y., Liu, F., Wu, D. (2007), “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts”,*Toxicology in Vitro*, 21 ,1058–1065.