

**T.C.**  
**GİRESUN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

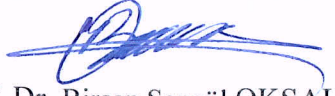
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PARABENİN AMES/SALMONELLA/MİKROZOM TESTİ İLE MUTAJENİK  
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**MELEK AYDOĞAN**

**OCAK 2016**

Fen Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

  
Prof. Dr. Birsen Şengül OKSAL

.../.../2016

Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak Biyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. İhsan AKYURT

  
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans Tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Doç. Dr. Emine YALÇIN

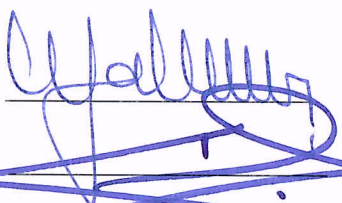
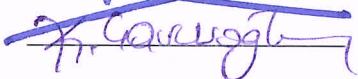
  
Danışman

Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Emine YALÇIN

Doç. Dr. Kültiğın ÇAVUŞOĞLU

Doç. Dr. Kürşat ÇAVUŞOĞLU

## ÖZET

### PARABENİN AMES/SALMONELLA/MİKROZOM TESTİ İLE MUTAJENİK AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

**AYDOĞAN, Melek**

**Giresun Üniversitesi**

**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman: Doç. Dr. Emine YALÇIN**

**Ocak 2016, 36 sayfa**

Ksenobiyotik kullanımın hızla artması ve gerekli güvenlik testlerinden geçmeden kullanılmaya başlanmasıyla birlikte kimyasalların insan sağlığı ve doğal kaynaklar üzerine olumsuz etkileri ortaya çıkmıştır. Ames testi ksenobiyotikler tarafından meydana gelen mutasyonların hücre düzeyinde belirlenmesi amacıyla kullanılan kısa zamanlı test sistemlerinden biridir. Bu çalışmada Ames Salmonella/mikrozom Testi uygulanarak parabenin mutajenik etkisi araştırılmıştır. Yöntemde Mutachromeplate test kiti ile *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşları kullanılmıştır. Deneyler S9'lu ve S9'suz olmak üzere iki grup halinde gerçekleştirilmiştir. S9'lu ve S9'suz ortamda tüm çalışma konsantrasyonlarında pozitif koloni sayıları, spontan pozitif koloni sayılarından daha fazla bulunmuştur. Paraben dozu arttıkça pozitif kuyucuk (koloni) sayısında arttığı belirlenmiştir. Her iki suş için en yüksek revertant koloni 100 µg/plak paraben dozunda elde edilmiştir. Sonuç olarak parabenin yüksek dozlarının TA 100 ve TA 98 suşları için S9 varlığında ya da yokluğunda mutajenik olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Paraben, Mutajenite, Ames, *Salmonella typhimurium*

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF THE PARABEN MUTAGENITY BY USING AMES/SALMONELLA/MICROSOM TEST

AYDOĞAN, Melek

University of Giresun

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Biology, Master Thesis

Supervisor: Assoc.Prof. Dr.Emine YALÇIN

January 2016, page 36

The increased use of xenobiotics without sufficient testing, has affected human health and natural resources negatively. Ames is a test system which can detect mutations caused by xenobiotics at cellular level. In this study, the mutagenic effect of paraben was investigated by the Ames Salmonella/microsome test. Mutachromoplate Test Kit, *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains were used in experiments. The mutagenic activity was screened in two groups with or without S9 metabolic activation. According to the results positive colony count was found higher than those spontaneous positive colony count among all of the concentrations and as well as under the conditions of with and without S9 ( $p>0.05$ ). Positive colony count were increased with increasing the paraben concentration. For TA 98 and TA 100 the maximum positive colony count was observe at a level of 100 µg/plate paraben. In conclusion, it was shown that paraben was mutagenic for TA 98 and TA 100 with or without S9 metabolic activation in higher dose.

**Keywords:** Paraben, Mutagenity, Ames, *Salmonella typhimurium*

## TEŞEKKÜR

Tez alıŐmalarım sűresince, engin deneyimi ve bilgi birikimi ile yol haritamın oluŐmasını saėlayan, fikirleri ve yol gűstericiliėi ile çalıŐmamın geliŐmesine imkan tanıyan, maddi manevi bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, sabırla beni yűnlendiren deėerli hocam Sayın Doç.Dr. Emine YALÇIN'a teŐekkűrű bir borç sayıyorum. Her konuda yardımlarını ve desteėini esirgemeyen deėerli hocam Sayın Doç. Dr. Kűltiėin AVUŐOėLU'na teŐekkűrlerimi sunarım. Tez çalıŐmamın deney aŐamalarında bana yardım eden Őėr.Gűr. Figen ÇİÇEK'e ve Betűl TAŐLI'ya teŐekkűr ederim. Bana bűtűn eėitim hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen anne ve babama sonsuz teŐekkűrlerimi sunarım.

FEN-BAP-C-250414-05 kodlu proje ile tezimi destekleyen Giresun Őniversitesi BAP birimine teŐekkűrűmű sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
TABLolar DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Toksikite Testleri.....	2
1.1.1.Comet Testi.....	3
1.1.2.Kromozom Anormallikleri Testi.....	4
1.1.3.Kardeş Kromatit Değişimi Testi.....	5
1.1.4. Mikronükleus Testi.....	6
1.1.5. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART).....	8
1.1.6. Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemi.....	8
1.2. Metabolik Aktivasyon (Biyotransformasyon).....	11
1.3. Paraben.....	13
2. MATERYAL VE METOT.....	15
2.1. <i>Salmonella typhimurium</i> test suşları.....	15
2.2. Parabenin sitotoksik etkilerinin saptanması.....	15
2.3. Ames testi uygulaması.....	15
2.3.1. S9 (-) Ames Testi Uygulaması.....	15

2.3.2. S9 (+) Ames Testi Uygulaması.....	17
2.3.3. Sonuçların değerlendirilmesi.....	18
3.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	19
4. TARTIŞMA .....	23
5. KAYNAKLAR.....	26
ÖZGEÇMİŞ.....	36



## TABLolar DİZİNİ

### TABLO

<b>Tablo 1.2.</b> Faz I ve Faz II enzimleri .....	12
<b>Tablo 2.1.</b> S9 Bileşenleri.....	17
<b>Tablo 3.1.</b> ParabeninMuta-ChromoPlate testinde pozitif kuyucuk sayıları .....	22





## ŞEKİLLER DİZİNİ

### ŞEKİL

Şekil 1.1.Comet testi; A. Mutajen etkisi ile kuyruk oluşumu, B. kuyruk analizi.....	4
Şekil 1.2. Kardeş kromatid testi a. Normal kromozom, b. Kardeş kromatit değişimi...5	
Şekil 1.3.Mikronükleus oluşumu ve MN içeren hücreler.....	7
Şekil 1.4. Ames testinin uygulanması ve revertant koloniler .....	11
Şekil 1.5. Farklı kimyasal yapılardaki Parabenin kimyasal yapıları.....	13
Şekil 2.1.Salmonella suşlarının aktivasyonu.....	16
Şekil 2.2. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması.....	16
Şekil 3.1. Muta-ChromoPlate testinde pozitif kuyucukların görünümü .....	20
Şekil 3.2.Parabenin Muta-ChromoPlate testinde pozitif kuyucuk sayıları.....	22

## 1. GİRİŞ

Artan endüstrileşme ile birlikte ortaya çıkan ve giderek artış gösteren çevre kirliliği uluslararası sorun olmaktan çok küresel sorun olarak kabul edilmektedir. Son yıllarda gözlenen sıcaklıkların artması, buzulların erimesi, fırtınalar ve doğal bitki örtüsündeki değişimler uluslararası alanda birçok ülkenin ortak çözüm arayışına gitmesini sağlamıştır. Gelişmiş ülkelerde artan endüstrileşmenin çevre ve insan sağlığı üzerine oluşturduğu risklerin minimuma indirilmesi konusunda pek çok ülkede çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Buna rağmen her geçen gün endüstriyel amaçlı kullanılan kimyasalların sayıları ve çeşitliliği de artmaya devam etmektedir. Bu artışın çevre ve insan açısından güvenilir olması için kullanılan kimyasalların toksik etkilerinin incelenmesi ve gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir. Bu sayede hem risk taşıyan kimyasalların etkilerinden korunmuş hem de bu kimyasalların oluşturdukları problemlerin çözümü için gerekli olan zaman ve maliyet ortadan kalkmış olacaktır (1). Kimyasal maddelerin gerekli güvenlik testlerinden geçmeden kullanılmaya başlanmasıyla birlikte kimyasalların insan sağlığı ve doğal kaynaklar üzerine olumsuz etkileri ortaya çıkmıştır. Dünyada birçok ülkede kimyasalların karsinogenik ve mutajenik aktiviteleri için test sistemleri geliştirilmiş ve bu şekilde kimyasalların toksik etkileri detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışmalar karsinogenite ve mutajenite arasında bağlantı olduğunu ortaya koyduğundan, kimyasal maddelerin mutajen/karsinogen olarak incelemesinin daha doğru olduğu kabul edilmektedir (2).

Mutasyonlar genetik materyallerin doğrudan etkilenmesi sonucu somatik hücrelerde veya germ hücrelerinde ortaya çıkmaktadır ancak her mutasyon kansere dönüşmemektedir. Karsinogen maddeler genellikle DNA (deoksiribonükleik asit), RNA (ribonükleik asit) ve proteinlerdeki nükleofilik gruplara kolaylıkla saldırabilen elektrofillik yapıları maddelerdir (3). Mutajenik etkinin aydınlatılması ve mutajenlerin saptanması için çeşitli test sistemlerinin geliştirilmesi ve mutajenezisin insanlar için oluşturduğu kalıtsal hastalık ve kanser riskinin azaltılması için yapılan çalışmalar genetik toksikolojinin en önemli araştırma alanlarından birini oluşturmaktadır (4-5).

## 1.1. Toksikite Testleri

Kimyasal maddelerin birçoğu, canlıların kalıtsal bilgisinde değişikliklere yol açan, genotoksik ve karsinojenik etkilere sahip olan maddelerdir. Bu maddelerin organizmada oluşturduğu hasar toksisite olarak adlandırılmaktadır. DNA veya genomun kopyasının çıkarılmasını sağlayan enzimlerle etkileşime giren ve mutasyona neden olan genotoksik maddelerin DNA’da hasar meydana getirmesi veya bazı değişimlere yol açması ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (6-9). Bu etkiler 1970 yılından beri kullanılan mutajenite testleri ya da genetik toksisite testleri ile araştırılmıştır. Mutajenik maddelerin karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok mutajenite testi geliştirilmiştir (10). Mutajenite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi önemli bir unsurdur (11).

DNA molekülünde mutasyonlara yol açan ajanlar ya da mutajenler, DNA üzerindeki etkilerini ya doğrudan, ya da genomik bilgilere göre sentezlenen proteinlere bağlanarak dolaylı yolla gösterirler. DNA hasarında rol alan kilit moleküllerde ve yollardaki bozukluklar ise doku hasarı, yaşlanma, kanser, infertilite ve bazı genetik ve multifaktoryal hastalıklara yol açmaktadır (12,13).

Çağdaş teknoloji insanlara sunduğu kolaylıkların yanı sıra, büyük bir sorun olan kontaminasyon sorununu da beraberinde getirmekte ve bu durum canlı organizmaların tümünü olumsuz yönde etkilemektedir. Doğadaki canlılar; günlük yaşamlarında doğal ya da sentetik kimyasal maddelerle etkileşim içerisindeyler. Canlı yapısına herhangi bir yolla giren yabancı ajanlar “ksenobiyotik” olarak adlandırılmaktadır. Sağlık açısından önemli ksenobiyotik sınıflarına; ilaçlar, kimyasal karsinojenler, poliklorlubifeniller ve insektisitler örnek verilebilirler. Çevreye kontrolsüz olarak dağılan ksenobiyotiklerin canlı yapısına girmesi kalıtsal doğum bozuklukları, kalp hastalıkları, yaşlanma, katarakt ve gelişimsel doğum bozuklukları gibi sorunlara neden olmakta, ayrıca bu ajanların çeşitli kanser türlerinin temel nedeni olduklarına ilişkin hipotezler, gün geçtikçe daha fazla kabul görmektedirler (14).

Ksenobiyotiklerin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik potansiyellerini ölçebilmek için birçok genotoksisite testi geliştirilmiştir (10). Bu testler, çeşitli mekanizmalarla

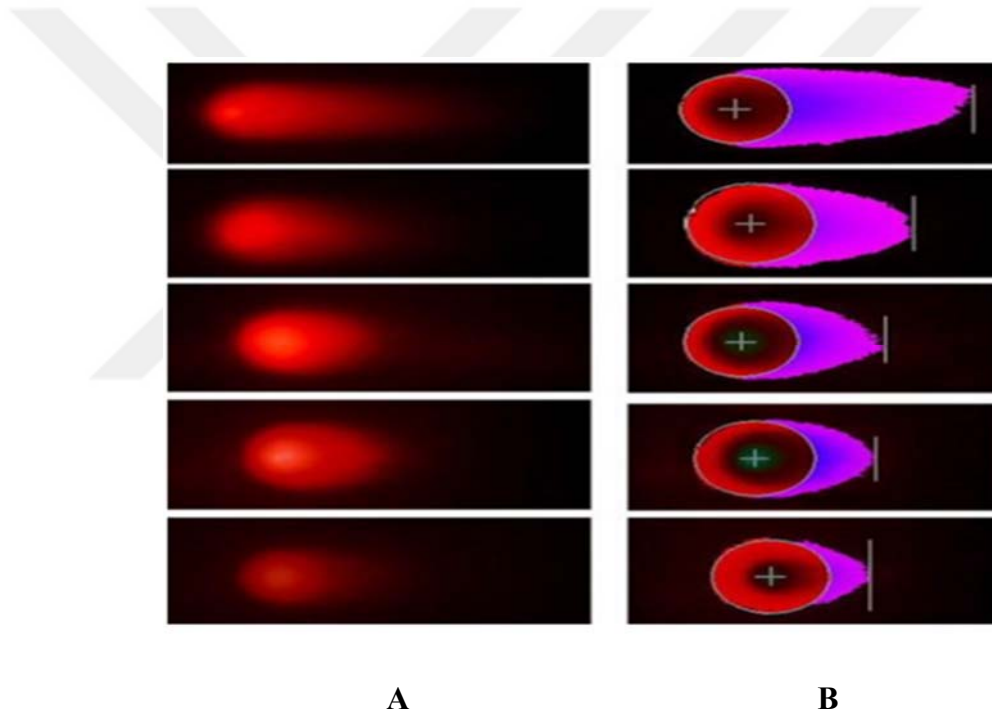
doğrudan ya da dolaylı olarak genetik materyalde meydana gelen hasarları saptamak amacıyla geliştirilmiş in vitro ve in vivo testlerden oluşmaktadır (6,9,11). Genotoksisite testleri ile mutajenlerin tanımlanması, insanda risk tayininin yapılması ve bu maddelere gereksiz maruziyetin önlenmesi genetik toksikolojinin başlıca amaçlarını oluşturmaktadır. Genellikle kısa dönem mutajenite testleri tarama amaçlı kullanılırken, memeli testleri insanda risk tayini için kullanılmaktadır (11). Genotoksisite testleri esas olarak genomu etkileyebilecek UV ve radyasyon gibi fiziksel etkenlerin, parazitik enfeksiyonların, sigara, pestisitler, ilaçlar, gıda katkı maddeleri, nanomateryaller gibi birçok kimyasal ajanın genotoksik ve kanserojenik potansiyellerinin tespitinde, ilaçların hem piyasaya sürülmeden önce hem de ilaç kullanan kişilerdeki genetik etkilerini ve güvenilirliğini araştırmada, bazı hastalıklarda artmış DNA hasarının tespitinde, genetik hasar ile hastalıklar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde, kansere duyarlılığın tayininde kullanılmaktadır (6,13,13-24). Bileşiklerin genotoksik etkisinin saptanmasında tek bir testin tek başına yeterli olmadığına, bu nedenle bileşiklerin genotoksik ya da mutajenik aktivitesinin belirlenmesinde çoklu test sistemleri kullanılmaktadır (6,8,22,23).

Comet testi (gen dönüşümleri ve DNA kırılmaları), kromozom anormallikleri (CA=chromosomeaberration) testi, kardeş kromatit değişimi (SCE =sisterchromatidexchange), mikronükleus testi (MN), programlanmamış DNA sentezi (UDS=unscheduled DNA syntesis), SOS kromotest, transformasyon yöntemi, Hipoksantinguaninfosforiboziltransferaz (HPRT) ileri mutasyon testi, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve Ames/Salmonella yöntemi genotoksisite ve mutajenite tayininde sık kullanılan testlerdir (25-27).

### **1.1.1.Comet Testi**

İlk olarak 1984 yılında Östling ve Johanson tarafından geliştirilmiş olan Comet testi daha sonra Singh ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir (28). Comet testi DNA hasarının tayininde, kanser hastalarında DNA hasarının derecesini ve tamirini tespit etmede, bazı kalıtsal hastalıkların tanısında ve DNA hasarını belirlemede kullanılan bir testtir. Çeşitli ajanların neden olduğu DNA çift ve tek zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Mikroskop lamı üzerindeki agaroz

jel içine gömülen hücreler, zarların parçalanıp çekirdekte bulunan süpersarmal DNA'nın serbestleşmesi için lizis işlemine tabi tutulmaktadır. Test, alkali ortamda süpersarmal yapının gevşeyerek açılması, kırılması ve elektroforezde kırılmış DNA zincirlerinin kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturması temeline dayanmaktadır (29,30). Floresans mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA, comet (kuyruk) oluşturmazken hasar görmüş DNA moleküllerindeki fragmentler farklı moleküler ağırlıklarına ve farklı elektrik yüklerine sahip olacaklarından elektriksel alanda farklı hızlarda hareket ederek çekirdekte dışarı doğru göç etmekte ve kuyruklu yıldız görünümü oluşturmaktadır. Kuyruk alanı/uzunluğu analizi ile test edilen ksenobiyotiğin mutajenitesi belirlenebilmektedir (31-36).



**Şekil 1.1.** Comet testi; A. Mutajen etkisi ile kuyruk oluşumu, B. kuyruk analizi (37)

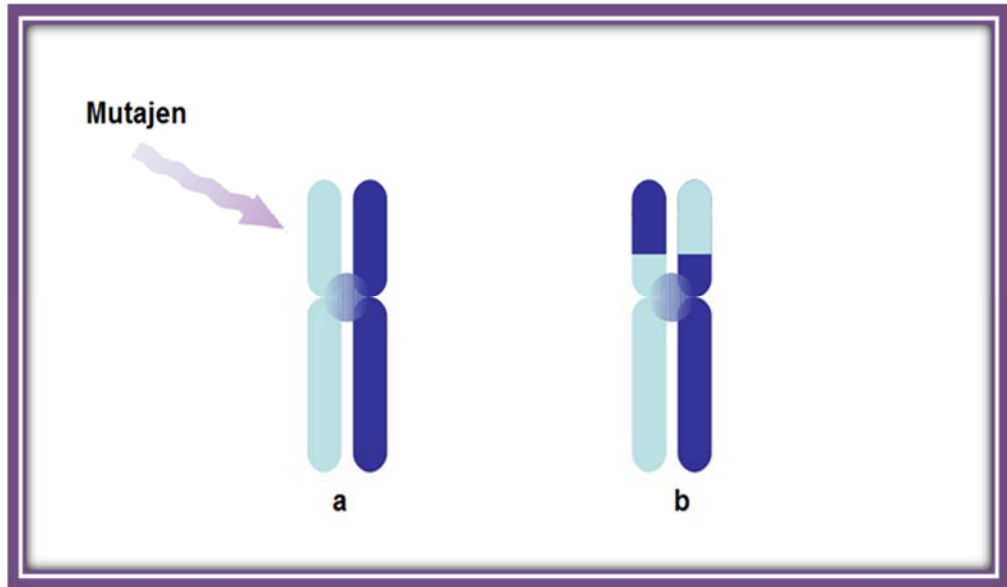
### 1.1.2. Kromozom Anormallikleri Testi

Kromozom anormalliği testi, kromozomal hasarın ve genom kararsızlığının biyolojik göstergesi olarak kullanılmaktadır (38,39). Kromozomal anormallikler, kendiliğinden

veya kimyasal/radyasyon uygulamasının bir sonucu olarak meydana gelen normal kromozom yapısındaki (yapısal anormallik) veya sayısındaki (sayısal anormallik) değişikliklerdir. Dolaşımdaki lenfositlerde kromozomal anormalliklerin artan sıklığı, genellikle DNA'ya hasar veren maddelere maruz kalanlar için artan kanser riskinin bir göstergesi sayılmaktadır (38,40,41). Kromozom kırıkları DNA'daki onarılmamış çift zincir kırıklarından ya da DNA'da ki zincir kırıklarının yanlış onarılmasından kaynaklanmaktadır. Genetik materyalde meydana gelen hasarlar tamir edilemediğinde oluşan yüksek kromozom anormalliği kanser riskini arttırmaktadır (20,21,23,42,43). Kromozom anormalliği testi mutajenler tarafından indüklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin saptanması amacıyla kullanılan standart bir yöntemdir. Invitro kromozom anormalliği testi ile memeli hücre kültürlerinde, in vivo kromozom anormalliği testi ile kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliği frekansı değerlendirilebilmektedir (44,45).

### 1.1.3.Kardeş Kromatit Değişimi Testi

Kardeş kromatit değişimi (KKD), kromozom morfolojisi değişmeksizin, kardeş kromatitler arasında, özdeş segmentlerin simetrik genetik materyal alışverişi sonucu oluşan bir değişimdir (şekil 2). Kardeş kromatit değişimleri nokta mutasyonlarının indüksiyonu, gen amplifikasyonu ve sitotoksosite ile ilişkilidir (46-49).



**Şekil 1.2.** Kardeş kromatit testi a. Normal kromozom, b. Kardeş kromatit değişimi (50).

KKD testi, homolog kromozomlarının gen lokusları arasındaki DNA replikasyon ürünlerinin değişimini test etmektedir ve mikroskopik olarak gözlenebilen kromozomal hasarların gözlenmesine olanak sağlamaktadır (51,52). Özellikle DNA eklentileri oluşturan veya DNA replikasyonu ile etkileşime giren mutajen bileşiklerin saptanmasını sağlayan bu test; çeşitli ajanların mutajenik etkilerinin, deneysel çalışmalarda indikatör test olarak özellikle kromozomlarda oluşan yapısal değişimleri araştırmak yönünden önemli bir yer tutmaktadır (53-55). KKD testinde DNA kırıklarının görünür hale getirmek için hücre kültürlerine DNA'da timin analogu gibi davranan Bromodekosiüridin (BrdU) maddesi eklenmektedir ve bu maddenin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatitlerin arasına girmesi sağlanmaktadır. Hücreler çoğalırken DNA'ların replikasyonu sırasında yeni sentezlenen polinükleotid ipliğine ortamda bulunan BrdU içeren bromurasil nükleotidleri geçmektedir. KKD sıklığındaki artış, mutajenlerin neden olduğu genetik hasarın göstergesi olarak kabul edilmektedir (56-59).

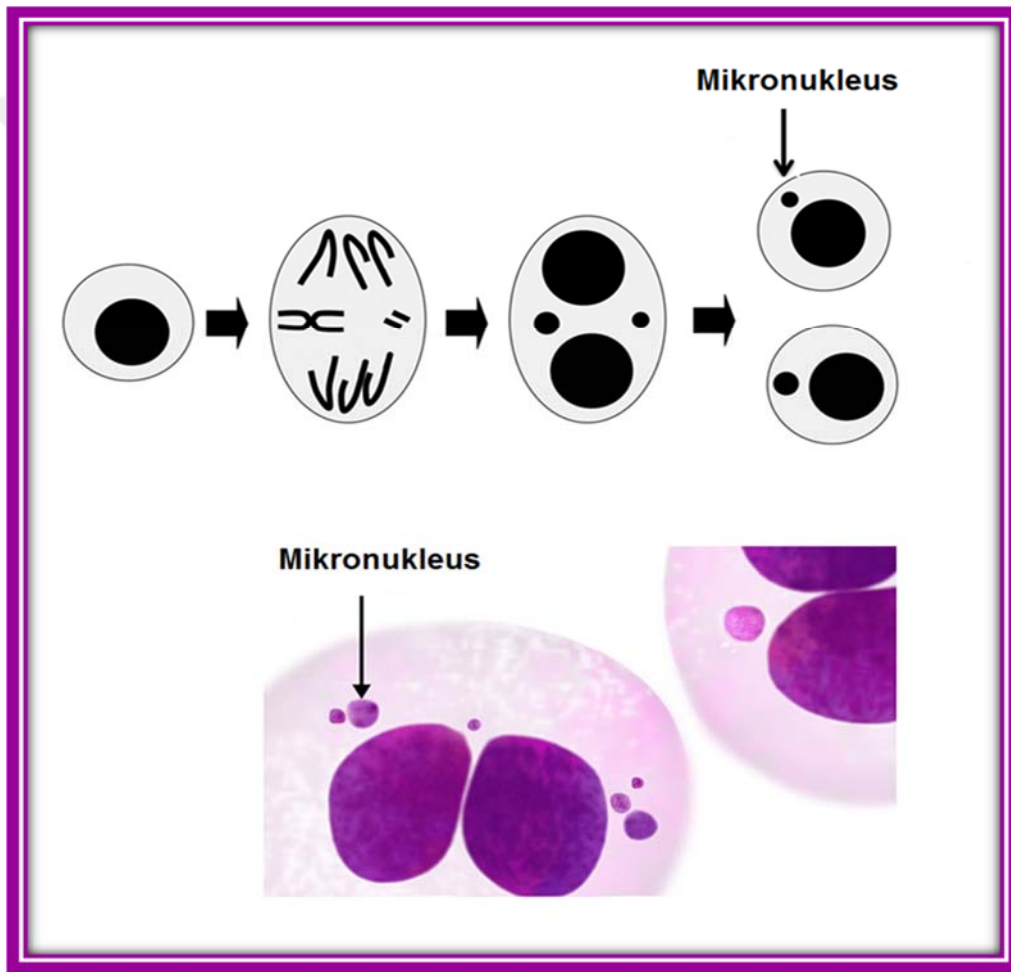
#### **1.1.4. Mikronükleus Testi**

Mikronükleus (MN)'lar hücrenin mitoz bölünmesi sırasında ortaya çıkan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlar olarak tanımlanmaktadır. MN testi 1950'lerde bitki hücrelerinde ve daha sonra kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal karsinojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır (26,60,61). Ayrıca sitogenetik harabiyetin tespitinde, kromozom analizine göre kolay uygulanabilmesi, daha fazla sayıda hücre sayılması ve istatistiksel yönden daha anlamlı sonuçlar elde edilmesi gibi avantajları sayesinde yaygın kullanım alanı bulan bir tekniktir (62-64).

MN 'ler genellikle hücre siklusunu kontrol eden genlerdeki eksikliklerden, mitotik iğdeki hatalardan, kinetokordan veya mitotik aygıtın diğer parçalarından ve kromozomal hasarlardan kaynaklanan, esas çekirdeğe dahil olmayan, tam kromozom veya asentrik kromozom fragmanlarından köken alan oluşumlardır.

MN sayısındaki artış, çeşitli ajanların hücrelerde oluşturduğu kromozom düzensizliklerinin ve somatik hücrelerde genomik kararsızlığın indirekt göstergesi olarak değerlendirilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlara maruz kalan insanlarda, kanser ve genomik düzensizlik ile karakterize edilen çeşitli hastalıklarda MN frekansının önemli ölçüde yüksek olduğu bulunmuştur (6,65-70). MN testi, mitoz bölünme ile oluşan tüm hücre tipleri üzerinde in vitro ve in vivo olarak uygulanabilmesi nedeniyle genetik toksikoloji araştırmalarında kullanılan yaygın bir test haline gelmiştir (69).



**Şekil 1.3.**Mikronükleus oluşumu ve MN içeren hücreler (70).



### 1.1.5. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kimyasalların mutajenik ve rekombinojenik aktivitelerinin saptanması için *Drosophila* ırkları ile gerçekleştirilen bir mutajenite testidir. Heterozigot veya hemizigot hayvanların vücut yüzeğinde hücre klonlarının değişimine öncülük eden mutasyon ya da rekombinasyonlardan dolayı heterozigotluğun kaybı esasına dayanır. SMART nokta mutasyonu, delesyon, kararsız translokasyon, mitotik rekombinasyon ve kromozom kaybı veya ayrılmama gibi kromozom aberasyonlarının tespitine izin veren hassas, ucuz ve kolay bir metottur (71).

### 1.1.6. Ames/Salmonella/Mikrozom Test Yöntemi

1975 yılında Prof. Dr. Ames ve Dr. Maron tarafından geliştirilen ve daha sonra yaygın olarak kullanılan bir mutajenite testidir (72). Ames testi olarak da adlandırılan Salmonella/mikrozom mutajenite testi, kimyasal maddelerin mutajenik etkilerinin araştırılmasında kullanılan, mutajen/karsinojen etkisi en iyi bilinen kimyasallarla geçerliliği en fazla kabul edilmiş bakteriyal test sistemlerinden biridir. Ayrıca ucuz, hızlı ve uygulanabilirliğinin kolay olması nedeniyle yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu test insanlarda ve deney hayvanlarında tümör oluşumunda, somatik hücrelerin tümör baskılayıcı genlerinde meydana gelen nokta mutasyonların saptanmasında ve kimyasalların DNA ile etkileşimlerini önleyerek mutajenik ve karsinojenik etkilerini ortadan kaldıran antimutajenik ve antikarsinojenik maddelerin tayininde de kullanılmaktadır(73,74)

Ames test sistemi özellikle kimyasal maddeler tarafından oluşturulan mutasyonları saptamak için geliştirilmiştir. Yıllardır birçok bilimsel topluluk, devlet kurumları ve şirket tarafından kabul edilmiş olup, kemirgen karsinojenitesinde yüksek öngörü potansiyeli taşıdığından, yeni kimyasalların ve ilaçların mutajenik potansiyellerini belirlemek için ön tarama testi olarak dünya çapında kullanılmaktadır (75).

Ames testinde, histidin operonunun değişik bölgelerinde farklı mutasyonlar içeren *Salmonella typhimurium*'un mutant suşları kullanılmaktadır. Bu testin temeli, *S. typhimurium*'un yapay mutasyonla oluşturulmuş olan histidin sentezleme

yeteneklerini kaybetmiş suşlarının, sitokrom P-450 enzimlerini içeren memeli karaciğer post mitokondriyal süpernatant (S9) varlığında veya yokluğunda, test bileşeni ile muamele edildikten sonra ikinci bir mutasyon geçirip histidini sentezleyebilen ve histidinden bağımsız ortamda çoğalması esasına dayanmaktadır. Histidinsiz ortamda üreyebilmelerine yol açan kendiliğinden geri mutasyon geçiren koloniler sayılarak mutajenite belirlenmektedir (Şekil 1.1). Eğer ortamda pozitif mutajen bir kimyasal madde varsa, geri mutasyonla çoğalan bakteri koloni sayısı istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmaktadır (73,74). Fakat normalde de mutajen maddelere maruz kalmadan spontan olarak geri dönüşebilen bakteri olmaktadır. Mutajenik etkiden bahsedebilmek için spontan revertant sayısından daha fazla sayıda revertant koloni sayılması gerekir (74-76). Bu test ile birçok mutajenik madde teşhis edilebilmektedir (74). Testte kullanılan Salmonella mutant suşları, histidin operonunun çeşitli genlerinde farklı mutasyonlara neden olmaktadır. Bu mutasyonlar, her biri çeşitli mekanizmalar üzerinden etki eden mutajenlere duyarlı olacak şekilde tasarlanmıştır. Bu suşlar *S. typhimurium* TA1535, TA1537, TA1538, TA97, TA98, TA100, TA102, TA104 suşlarıdır (72).

Histidin mutasyonu: Her bir test suşu, histidin operonunun farklı bölgelerinde ya DNA' daki tek bir bazın değişimi ya da bir bazın eklenmesi veya çıkarılması ile kendini gösteren çerçeve kayması mutasyonları ile mutant hale getirilmiştir (77). Mutasyonların yerleri ve karakterleri, *S. typhimurium* mutant suşlarının DNA baz dizi analizleri yapılarak belirlenmiştir (72).

HisG46 mutasyonu: *S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA1535 suşlarında histidin biyosentez yolundaki ilk enzimi kodlayan gen bölgesi üzerinde meydana gelmektedir. Bu mutasyon his G geninde lösin amino asidinin (GAG/CTC) kodonu olan -CUC- yerine prolin amino asidinin (GGG/CCC) kodonu olan -CCC-' nin gelmesiyle oluşmaktadır. *S. typhimurium* TA100 ve *S. typhimurium* TA 1535 suşları baz çifti değişimine sebep olan mutajenler tarafından geri döndürülebilmektedir (74).

HisD3052 mutasyonu: *S. typhimurium* TA98 ve *S. typhimurium* TA1538 suşlarında meydana gelmektedir. Bu mutasyon histidin biyosentezindeki son enzimi kodlayan his D geni üzerinde oluşmaktadır. HisD3052 mutasyonu his D genindeki tek bir nükleotid eksikliğinde ortaya çıkan çerçeve kayması tipinde bir mutasyondur (74).

HisC3076 mutasyonu: *S. typhimurium* TA1537 suşunda mevcut olup -CCC- tekrarlanan dizisine bir nükleotidin eklenmesiyle oluşan çerçeve kayması mutasyonudur. Çerçeve kaymasına neden olan mutajenlerin araştırılmasında *S. typhimurium* TA1537 suşundan daha hassas olan *S. typhimurium* TA97 suşunda ise hisD6610 mutasyonu meydana gelmektedir. Bu mutasyonda etkilenen bölge olan 6 tekrarlı sitozin dizisinin (-C-C-C-C-C-C-) yanına bir sitozin bazının eklenmesi çerçeve kayması mutasyonuna neden olmaktadır (74).

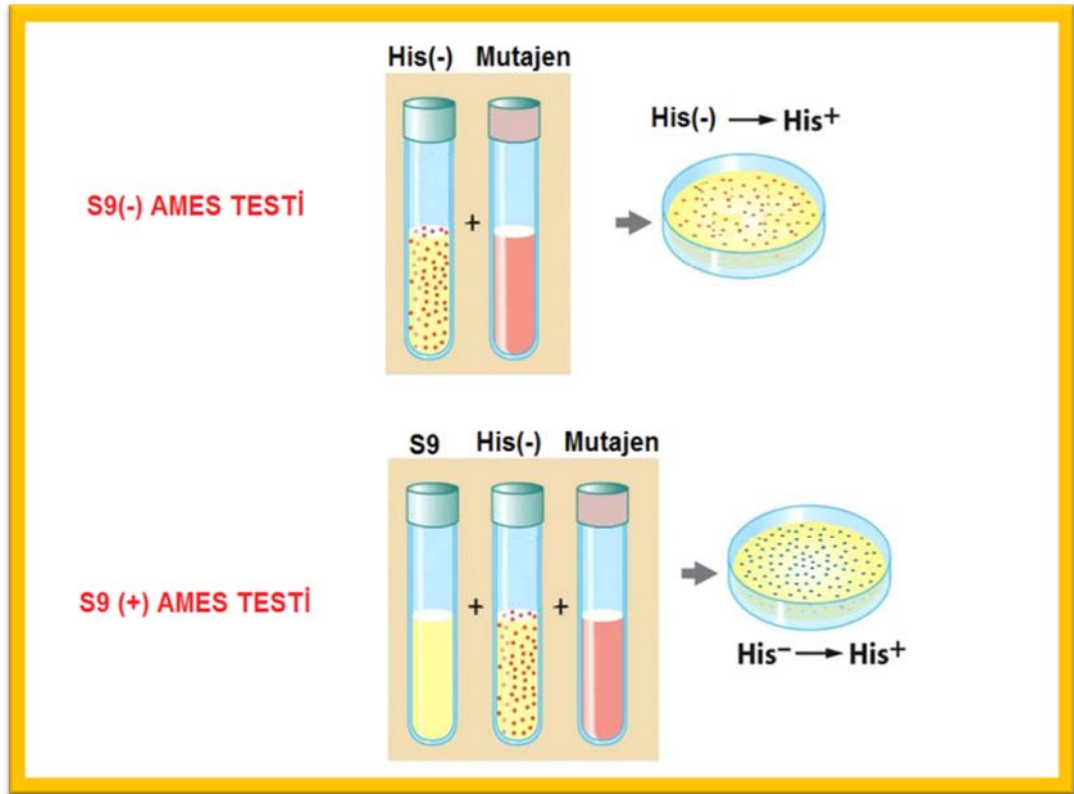
HisG428 mutasyonu: hisG428 gen bölgesinde meydana gelen bu mutasyon ochre mutasyonu olarak adlandırılır. Bu mutasyon *S. typhimurium* TA102 suşunda görülmektedir (74).

*S. typhimurium*'un his- mutantlarını kimyasal mutajenlere karşı daha hassas hale getirmek için Rfa, uvrB ve R faktörü gibi bazı mutasyonlar eklenmiştir.

Rfa mutasyonu: Bu mutasyon bakteri hücre duvarının lipopolisakkarit tabakasını kodlayan genlerde meydana gelmektedir. Lipopolisakkarit tabakasında meydana gelen bu hasar, hücre duvarının geçirgenliğinin artmasına neden olarak büyük moleküllerin geçmesine izin vermektedir (78).

uvrB mutasyonu: DNA onarım sisteminde, nükleotid kesme çıkarma onarımında görev alan ekzonükleaz enziminin uvrB geninde meydana gelen delesyon sonucunda olmaktadır. uvrB geninin kesilerek uzaklaştırılması esnasında "bio" geni de çıkarılmıştır. Bio geni H vitamini olarak adlandırılan biyotinin sentezinden sorumludur. Dolayısıyla mutant bakteriler üreyebilmek için histidin amino asidine ek olarak biyotine de gereksinim duyarlar (72). uvrB delesyonu nedeniyle nükleotid kesip çıkarma onarım mekanizması inaktive olacağından hata oranı yüksek SOS onarım sistemi tarafından daha fazla DNA lezyonunun onarılması mümkün olacaktır (74).

R faktörü: Ampisilin dirençlilik geni olup bu geni taşıyan bakterilerde normalde hücrelerde bulunan ve hata frekansı yüksek olan "error-prone" DNA onarım yolunun aktivasyonuna ve pozitif sonuçların artmasına neden olur. R faktörüne sahip olmayan suşlar zayıf mutajenik sonuçlar verirken R faktörü genini taşıyan pKM 101 plazmidine sahip yeni suşlar oldukça kuvvetli sonuçlar vermiştir. Bu test sisteminde genellikle kullanılan bakteri suşları TA 97, TA 98, TA 100, TA 102, TA 1535, TA 1538 suşlarıdır(79).



Şekil 1.4. Ames testinin uygulanması ve revertant koloniler (80).

## 1.2. Metabolik Aktivasyon (Biyotransformasyon)

1973 yılında Ames ve arkadaşları tarafından geliştirilen standart plak inkorporasyon test sistemi, zaman ile testin duyarlılığını artırmak amacıyla farklı araştırmacılar tarafından modifiye edilerek geliştirilmiştir. Böylece birçok kimyasal maddenin mutajenik potansiyelini belirlemek mümkün hale gelmiştir (74). Memelilerde biyotransformasyon olayı pek çok ksenobiyotiğin mutajenitesini de değiştirmektedir. Memelilerde detoksifikasyon mekanizmasını gerçekleştiren enzim sistemlerinin bakterilerde olmaması, Ames test sistemi için sorun yaratan bir unsur olarak düşünülebilir. Fakat memeli hayvanlardan izole edilen detoksifikasyon enzimlerinin bakteriyal sisteme ilave edilmesiyle bu sorun ortadan kalkmış olmaktadır (81). Yaygın olarak kullanılan enzim sistemi, sıçanların enzim aktivasyonu olan karaciğer dokularından elde edilen mikrozomal enzim fraksiyonlarıdır. Sitokrom P-450 bağımlı monooksijenazlar, sitokrom P-450 bağımsız oksidazlar, esterazlar ve transferazlar, azo ve nitroredüktazlar içeren enzim özütüne eklenen kofaktörler içeren tampon

sistemi S9 karışımı adını almaktadır. Bir ksenobiyotiğin toksisitesinin ayrıntılı olarak aydınlatılabilmesi için biyotransformasyon öncesi ve sonrasındaki mutajenitesi belirlenmelidir. Bu amaçla günümüzde Ames testi S9(+) ve S9(-) olmak üzere iki şekilde yürütülmektedir. S9(+) Ames testi ile bir molekülün vücuda alınıp biyotransformasyona uğradıktan sonraki mutajenitesi de test edilmiş olmaktadır.

Farmakolojik yönden etkin olan bir molekül organizmada biyotransformasyon tepkimeleri sonucu daha etkin metabolitlere dönüştürülebilir. Molekülün daha etkin ya da toksik olan metabolitlerinin şekillenmesiyle sonuçlanan biyotransformasyon tepkimeleri metabolikaktivasyon adını alır. Kimi zaman da inert bir molekül biyotransformasyon tepkimeleri sonucu etkin olan metabolitlere, daha sonra da inaktif ya da vücuttan atılabilir formlara dönüştürülür. Normalde farmakolojik yönden etkisiz olan fakat biyotransformasyon sonucu etkin metabolitlere dönüşen moleküllere prekürsör adı verilir. İnhalasyon anestezikleri gibi az sayıda da olsa organizmada hiçbir değişikliğe uğramadan vücuttan atılan moleküllerde vardır (82).

Biyotransformasyon sistemi varlığında, biyolojik olarak aktif bir madde inaktif bir metabolitine dönüşebileceği gibi, inaktif bir madde aktif bir metabolitine de dönüşebilmektedir (83,84). Çoğu biyotransformasyon tepkimesi sonucunda ilacın farmakodinamik etkinliği azalır ve eliminasyonu kolaylaşan metabolitleri şekillenir, bunlar detoksifikasyon (inaktivasyon) tepkimeleri olarak da adlandırılır.

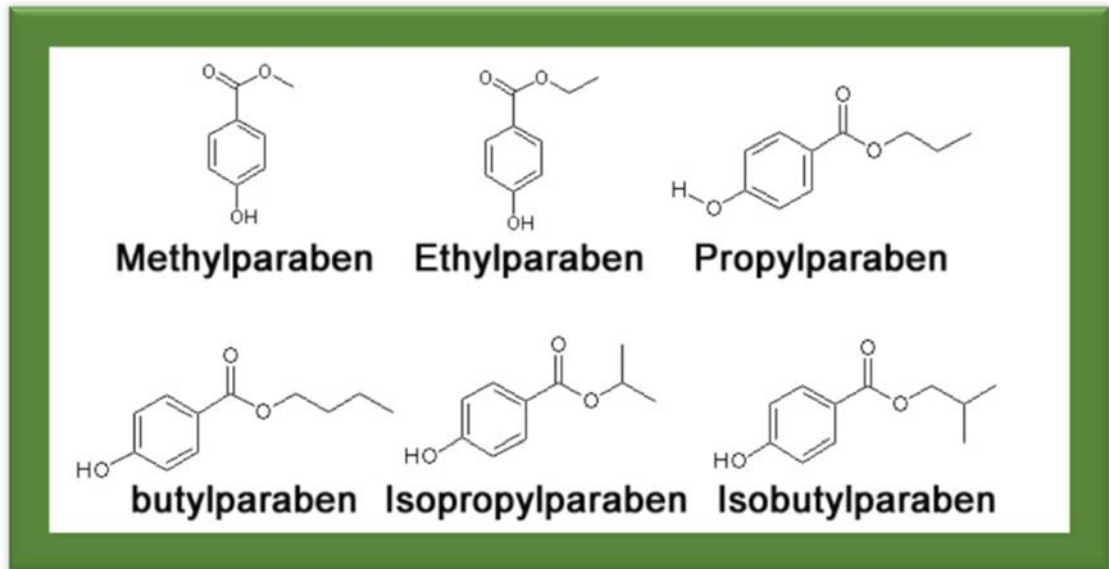
**Tablo1.2.** Faz I ve Faz II enzimleri

<b>Faz I Enzimleri</b>	<b>Faz II Enzimleri</b>
Sitokrom p450 monooksijenaz	Glukuroniltransferaz1a1
Sitokrom p450 2b10	Sülfotransferaz
Aldehit dehidrogenaz 1a1	Glutasyon-S-transferaz
Aldehit dehidrogenaz 1a7	N-asetiltransferaz
Sitokrom p450 a11	Kinonredüktaz
Alkol dehidrogenaz	Metil transferaz

Organizmada ilaçların biyotransformasyonda görevli enzimler başta karaciğer olmak üzere plazma, sindirim kanalı, akciğer böbrek, plasenta ve sinir sisteminde lokalize olmuşlardır. Biyotransformasyon tepkimeleri degradasyon (I. Faz) ve konjugasyon (II. Faz) fazları olarak ikiye ayrılmaktadır. Moleküller genel olarak önce degradasyon, bu tepkimeler sonucu oluşan metabolitler de konjugasyon tepkimelerine uğrarlar. Konjugasyon (birleştirme) tepkimeleri sistematik olarak biyolojik yönden inaktif, hidrosolübl ve böbrekle kolay elimine edilebilir bileşiklerin oluşumuyla sonuçlanmaktadır (82).

### 1.3.Paraben

Parabenler kozmetik ürünlerde, ilaçlarda ve gıdalarda antimikrobiyal amaçlı kullanılan koruyuculardır. Ucuz olmaları ve düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle tercih edilmektedirler. Avrupa kozmetik yönergesinde kozmetiklerin içerebileceği paraben oranları tek ester için %0.4, ester karışımları için %0.8 olarak belirlenmiştir. Metil paraben, etilparaben, propilparaben, izopropilparaben, butilparaben, izobutilparaben, benzilparabenparaben gruplarını oluşturan bileşiklerdir (Şekil 1.5) (85).



Şekil 1.5. Farklı kimyasal yapılarıdaki Parabenin kimyasal yapıları (86).

Uzun alkil zincirine sahip parabenlerin yüksek sitotoksosite sergilediği belirlenmiştir (87). Parabenler dermal absorpsiyon sonrasında karaciğer ve bağırsakta esterazlar tarafından metabolize edilmektedir. Parabenler östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik etki gösterirler. Invitro ortamda insan meme kanser hücrelerinin büyümesini tetikledikleri belirlenmiştir. Propil ve butilparabenlere erken çocukluk döneminde maruz kalınması ile erkeklerde fertilité üzerine olumsuz etkileri olabileceğine dair bilgiler mevcuttur (88,89). Metil ve propilparabenlerin mitokondri fonksiyonlarının kuvvetli inhibitörleri olmaları nedeniyle erkek infertilitesinde etkili olduğu belirlenmiştir (90). Fareler üzerinde yapılan bir deneyde gebelik ve emzirme döneminde annenin yüksek dozlarda butilparaben maruziyetinin (100mg/kg dozda subkutan uygulama) yeni nesil epididimiste sperm sayı ve motilitesinin azaldığı gösterilmiştir (91). Çeşitli genotoksik çalışmalarda parabenlerin genel olarak mutajenik olmadıkları belirtilse de etil ve metilparabenlerin hamster over hücrelerinde kromozomal anomalileri arttırdığı saptanmıştır (88).

Parabenler zayıf östrojenik aktivite göstererek MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını indüklediği belirlenmiştir. Bu durum parabenin insan deri hücrelerinde sitozolde bulunan sülfotransferaz aktivitesini inhibe etmesi sonucu östrojen düzeyinde görülen değişimler ile açıklanmıştır (85). Sülfotransferaz enzimleri östradiolün östrona dönüşümünü sağlayarak östrojen metabolizmasını düzenlemektedir (92,93). Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu östrojen metabolizmasında aksamalara neden olmaktadır.

Literatürde paraben ve esterlerinin toksisitesi üzerine çalışmalar daha çok endokrin sistem üzerine etkilerine odaklanmıştır. Parabenin mutajenitesi üzerine çalışmalar oldukça yetersizdir. Bu çalışmada Parabeninin mutajenitesi Muta-ChromoPlate™ kiti kullanılarak S9(+) ve S9 (-) Ames testi ile araştırılmıştır.

## 2. MATERYAL VE METOT

### 2.1. *Salmonella typhimurium* test suşları

Bu çalışmada *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 suşları kullanılmıştır. *Salmonella typhimurium*'un TA98 suşu çerçeve kayması mutasyonu, TA100 suşu ise nokta mutasyonu özelliği taşımaktadır (94). Paraben uygulama dozları olarak 5 µg/plak, 10 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak ve 100 µg/plak konsantrasyonları hazırlanıp bakteriler üzerinde denenmiştir. Deneyde her doz her suş için 3 plak halinde test edilmiştir. Ayrıca pozitif kontrol ve solvent kontrol deneye paralel olarak uygulanmıştır. Çalışmamızda, pozitif mutajen olarak 2-aminofluoren (0.1 ml/plak) kullanılmıştır (95).

### 2.2. Parabenin sitotoksik etkilerinin saptanması

Kullanılan test maddelerinin test bakterileri için öldürücü dozunun saptanması amacıyla top ağara 0.1 ml bakteri kültürü ve 0.1 ml test maddesinin farklı konsantrasyonları eklenmiştir. Tüpteki karışım Nutrient Agar plaklarına dökülmüş ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

### 2.3. Ames testi uygulaması

#### 2.3.1. S9 (-) Amest Testi Uygulaması

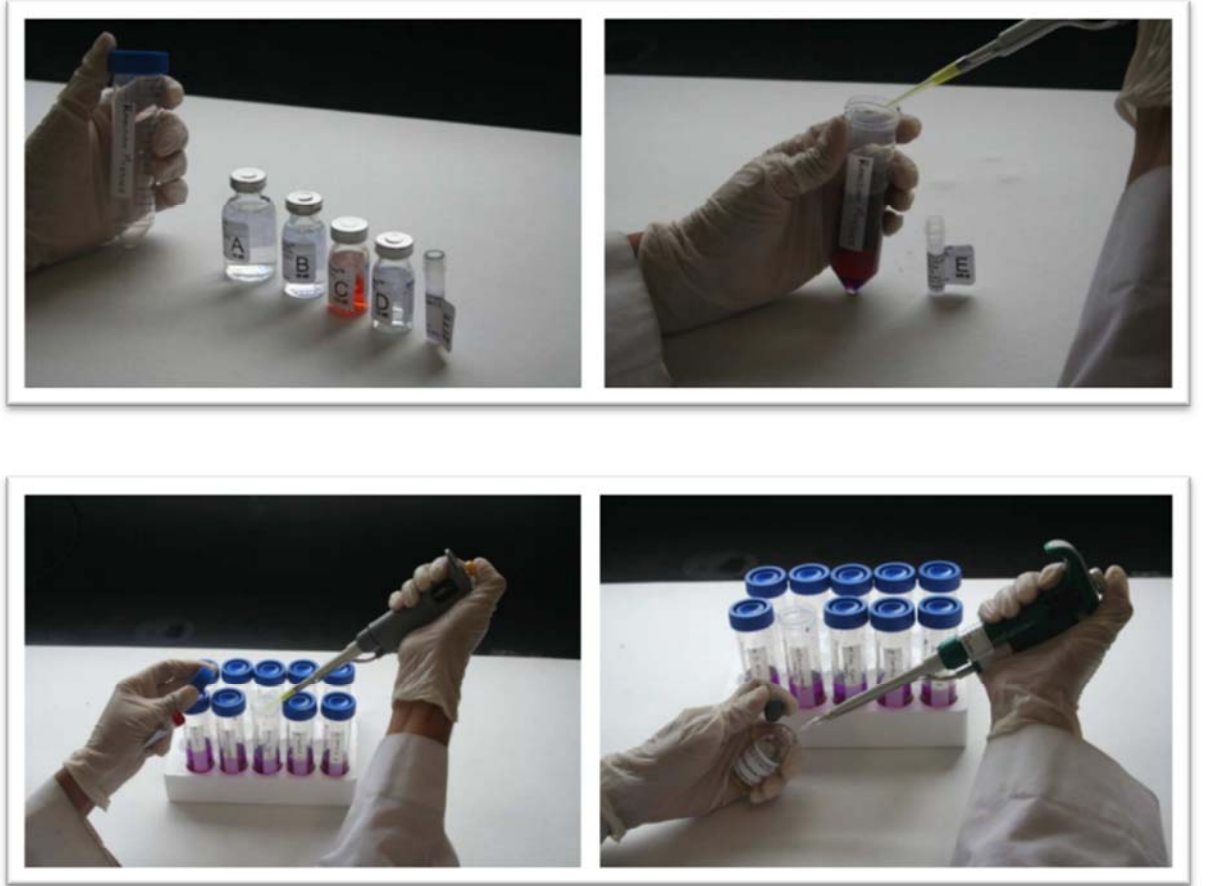
Muta-ChromoPlate™ kit ile Ames testi geleneksel yöntemlerle yapılan testlere kıyasla daha kullanışlıdır çünkü yüksek konsantrasyonlarda örneklerin uygulanmasına da izin vermektedir. Kit içeriğinde besiyeri, bakteri içeren vialer steril enjektörler yardımı ile aktarılmış ve 37°C'de 16 -18 saat süre ile inkübe edilerek suşlar canlandırılmıştır (Şekil 1.2.) (96).





Şekil 2.1. Salmonella suşlarının aktivasyonu (96).

Kit içerisinde bulunan çözeltiler kullanılarak çeşitli reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Steril tüplere 2.5 ml hazırlanan reaksiyon karışımları ile 2.5 ml farklı konsantrasyonlarda paraben çözeltileri ilave edilmiş ve vortekslenmiştir.



Şekil 2.2. Reaksiyon karışımlarının hazırlanması (96).

Pozitif kontrol olarak işaretlenen tüplere 100 mikrolitre 2-aminofluoren, negatif (solvent) kontrol tüplerine 100 mikrolitre dH<sub>2</sub>O, test tüplerine ise 100 mikrolitre farklı konsanrasyonlarda paraben eklenmiştir. Tüm tüplere 5 mikrolitre bakteri kültürü eklenmiş ve karışım vortekslenmiştir. Tüplerden alınan 200 mikrolitrelik örnekler 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş, 5 gün süre ile 37°C’de plaklar inkübe edilmiştir. Plaklara örneklerin aktarılması aşamasında tüm plaklar mor renkli çözelti içermektedir (Şekil 2.2).

### 2.3.2.S9 (+) Ames Testi Uygulaması

Parabenin mutajenitesi üzerine biyotransformasyonun etkisini belirlemek için farklı dozlardaki paraben çözeltisi S-9 karışımı ile 2 saat süre ile etkileştirilmiş ve aynı prosedür tekrar edilmiştir. S-9 karışımı bileşenleri Tablo 2.1’ de verilmiştir.

Tablo 2.1. S9 bileşenleri	
<b>S9A</b>	MgCl <sub>2</sub> + KCL
<b>S9B</b>	Glukoz-6-Fosfat
<b>S9C</b>	NADP
<b>S9D</b>	Fosfat Tamponu
<b>S9E</b>	Steril Distile Su
<b>S9F</b>	Sıçan Karaciğer Ekstraktı

### **2.3.3. Sonuçların değerlendirilmesi**

Mutasyon oluşumu kolonideki bakterilerin yeniden histidin sentezlediğine, büyümeye devam ettiğine ve kuyucukdaki mor renkli zeltinin sarıya dönmesine neden olmaktadır. Renk dönüşümü gözlenen kuyucuklar pozitif kuyucuk olarak, her bir pozitif kuyucuk ise bir koloni olarak değerlendirilmiştir.

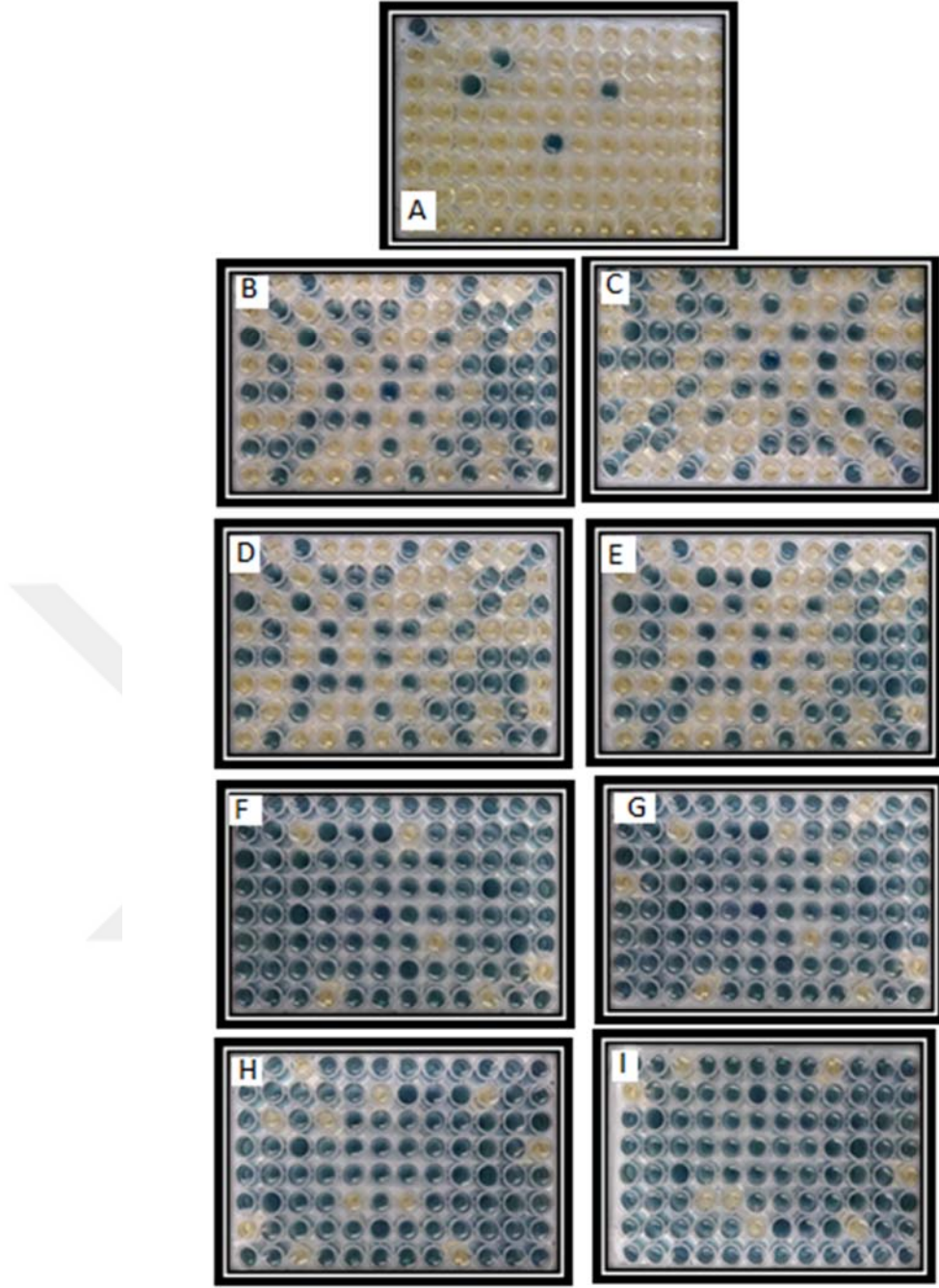


### 3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu çalışmada endüstriyel sektörlerde kullanılan parabenin farklı dozları Ames testi ile araştırılmış ve parabenin mutajenitesi incelenmiştir. Parabenin mutajenitesi 5 µg/plak, 10 µg/plak, 25 µg/plak, 50 µg/plak ve 100 µg/plak konsantrasyonlarında Ames S9 (+) ve S9 (-) olmak üzere iki uygulama ile değerlendirilmiştir.

Muta-ChromoPlate testinde kuyucukdaki mor renkli çözeltinin sarıya dönmesi (pozitif kuyucuk) mutajeniteye işaret etmektedir. Her bir kuyu bir koloni olarak değerlendirilmiş ve renk dönüşümü gözlenen sarı renkli kuyucuklar revertant koloni olarak değerlendirilmiştir. Parabenin farklı dozlarına ait pozitif kuyucuk sayıları Tablo 3.1, Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de verilmiştir. Tablo ve şekilde de görüldüğü gibi paraben konsantrasyonunun artışı ile birlikte pozitif kuyucuk sayısının arttığı belirlenmiştir.

TA 98 ve TA 100 suşları ile yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde, S9’lu ve S9’suz ortamda elde edilen koloni sayıları, pozitif kontrol olarak kullanılan 2-aminofluorende elde edilen koloni sayılarına kıyasla oldukça düşüktür. Fakat mutajenik özellik sergileyecek seviyededir. Paraben dozu arttıkça pozitif kuyucuk (koloni) sayısında arttığı belirlenmiştir. Her iki suş için en yüksek revertant koloni 100 µg/plak paraben dozunda elde edilmiştir. Ayrıca S9 (-) testinde elde edilen pozitif kuyucuk (koloni) sayısının S9 (+) ‘a kıyasla daha yüksek olduğu fakat aradaki bu farkın istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.2.).



**Şekil 3.1.** Muta-ChromoPlate testinde pozitif kuyucukların görünümü A) Solvent kontrol, B) TA 98 S9 (-)/100 µg/plak, C) TA 98 S9 (+)/100 µg/plak, D) TA 100 S9 (+)/100 µg/plak, E) TA 100 S9 (-)/100 µg/plak, F) Pozitif Kontrol TA 98 S9 (-)/100 µg/plak, G) Pozitif Kontrol TA 98 S9 (-)/100 µg/plak H) Pozitif Kontrol TA 100 S9 (-)/100 µg/plak I) Pozitif Kontrol TA 100 S9 (+)/100 µg/plak

S9 (-) TA 98 suşu ile test edilen 100 µg/plak paraben dozunda gözlenen pozitif koloni sayısının 5 µg/plak paraben dozunda gözlenen sayıya kıyasla 3.4 kat fazla olduğu, aynı suşun S9 (+) testinde ise 100 µg/plak paraben dozunda gözlenen pozitif koloni sayısının 5 µg/plak uygulamasına kıyasla 5.4 kat fazla olduğu belirlenmiştir. S9 (-) ve S9 (+) uygulamaları için 100 µg/plak ve 5 µg/plak uygulama arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

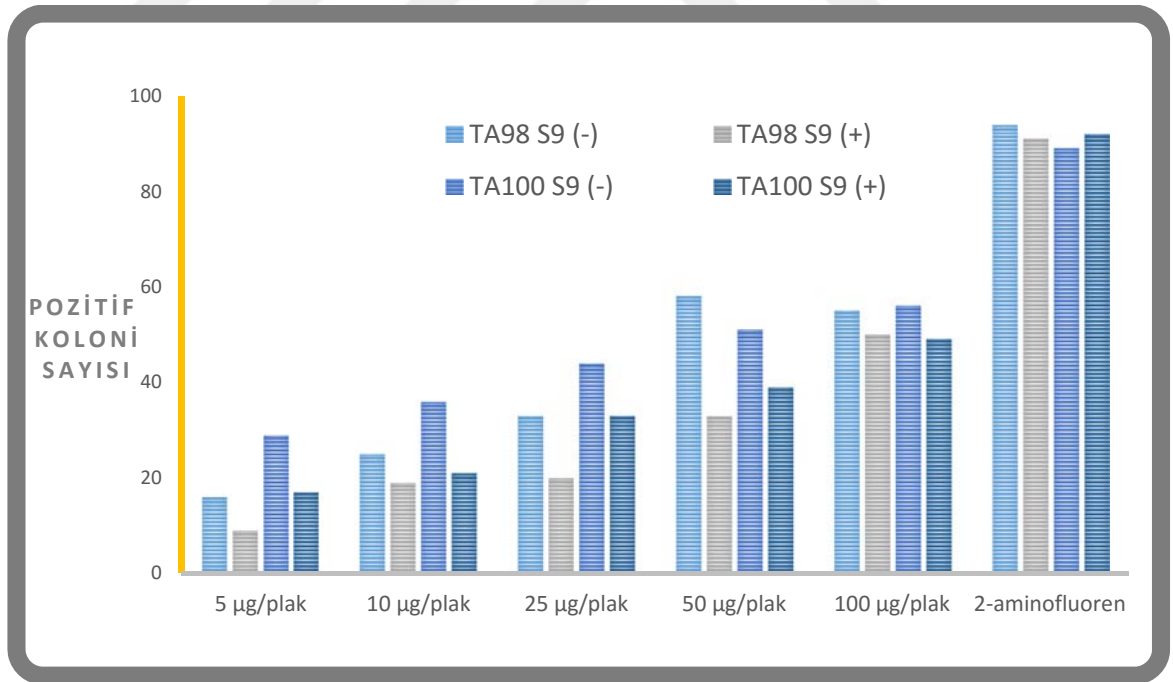
S9 (-) TA 100 suşu ile test edilen 100 µg/plak paraben dozunda gözlenen pozitif koloni sayısının 5 µg/plak paraben dozunda gözlenen sayıya kıyasla 1.93 kat fazla olduğu, aynı suşun S9 (+) testinde ise 100µg/plak paraben dozunda gözlenen pozitif koloni sayısının 5 µg/plak uygulamasına kıyasla 2.8 kat fazla olduğu belirlenmiştir. S9 (-) ve S9 (+) uygulamaları için 100 µg/plak ve 5 µg/plak uygulama arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Benzer kıyaslama pozitif kontrol olarak kullanılan 2-aminofluoren ile yapıldığında; S9 (-) TA 98 suşu ile test edilen 2-aminofluoren uygulamasında gözlenen pozitif koloni sayısının 100 µg/plak paraben dozunda gözlenen sayıya kıyasla 1.7 kat fazla olduğu, aynı suşun S9 (+) testinde ise 2-aminofluoren uygulamasında gözlenen pozitif koloni sayısının 100 µg/plak uygulamasına kıyasla 1.82 kat fazla olduğu belirlenmiştir. S9 (-) ve S9 (+) uygulamaları için 100 µg/plak ve pozitif uygulama arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

S9 (-) TA 100 suşu ile test edilen 2-aminofluoren uygulamasında gözlenen pozitif koloni sayısının 100 µg/plak paraben dozunda gözlenen sayıya kıyasla 1.58 kat fazla olduğu, aynı suşun S9 (+) testinde ise 2-aminofluoren uygulamasında gözlenen pozitif koloni sayısının 100 µg/plak uygulamasına kıyasla 1.87 kat fazla olduğu belirlenmiştir. S9 (-) ve S9 (+) uygulamaları için 100 µg/plak ve pozitif uygulama arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ( $p<0.05$ ).

**Tablo 3.1.** Parabenin Muta-ChromoPlate testinde pozitif kuyucuk sayıları (Ort±SS)

<b>Konsantrasyon</b>	<b>TA98 S9 (-)</b>	<b>TA98 S9 (+)</b>	<b>TA100 S9 (-)</b>	<b>TA100 S9 (+)</b>
<b>5 µg/plak</b>	16±2	9±1	29±2	17±2
<b>10 µg/plak</b>	25±1	19±1	36±1	21±1
<b>25 µg/plak</b>	33±1	20±2	44±2	33±3
<b>50 µg/plak</b>	58±2	33±2	51±3	39±3
<b>100 µg/plak</b>	55±2	50±2	56±2	49±2
<b>2-aminofluoren</b>	94±3	91±2	89±3	92±3



**Şekil 3.2.**Parabenin Muta-ChromoPlate testinde pozitif kuyucuk sayıları

#### 4. TARTIŞMA

Ksenobiyotik sayılarının ve çeşidinin gün geçtikçe artması ve gerekli güvenlik testlerinden geçmeden kullanılmaya başlanması sonucu insan sağlığı ve doğal kaynaklar üzerinde olumsuz etkiler meydana gelmektedir. Kimyasal endüstrisinin gelişmesiyle, maruziyetin sıklığındaki artışa bağlı olarak çoğu kimyasal için toksisite değerlendirilmesi zorunlu hale gelmiştir (5,74). Çevremizde bulunan ve biyolojik etkileri henüz araştırılmamış olan sentetik ve doğal maddelerin mutajenik aktivitelerinin test edilmesi sağlığımız açısından önem arz etmektedir. İn vivo mutajenite testlerinin çok zaman almaları ve pahalı olmaları nedeniyle yüksek verim elde edilememektedir. Bu nedenle, kimyasal maddelerin kanserojenik potansiyellerini ölçebilmek için, pekçok in vitro test sistemi geliştirilmiştir. Kısa zamanlı testler ile ksenobiyotiklerin olumsuz etkileri incelenmekte ve elde edilen sonuçlarla maddelerin kanserojenik potansiyelleri arasında ilişki kurulmaktadır (97).

Dr. Bruce Ames tarafından geliştirilmiş olan ve kimyasal maddelerin mutajenik etkilerini belirlemek amacıyla tarama testi olarak uygulanan Ames testi, güvenilir ve kısa zamanlı az maliyetli bakteriyel test sistemi olarak kullanılmaktadır (5). Bu çalışmada endüstriyel amaçla sıkça kullanılan parabeninin mutajenitesi Muta-ChromoPlate kiti kullanılarak S9(+) ve S9(-) Ames testi ile araştırılmıştır. Biyotransformasyon sonrasında oluşan metabolitlerinde toksik etkiye sahip olup olmadığının incelenmesi için hem S9'lu hem de S9'suz ortamda aktivite tayini yapılmıştır. Böylece memeli karaciğerinde enzimatik yollarla parçalanarak farklı metabolitlere çevrilmesiyle oluşan bileşiklerin, mutajenik özelliğe sahip olabilme ihtimali de araştırılmıştır. Parabenin endokrin ve üreme sistemi üzerine etkileri konusunda pek çok çalışma yapılmış olmakla birlikte Ames Salmonella/mikrozom testi ile yapılan bakteriyel mutajenite çalışmaları oldukça sınırlıdır. Literatürde Ames testi ile çok farklı ksenobiyotikler test edilmiş ve farklı boyutlarda sonuçlar elde edilmiştir. Ames testi ile çevre kirleticileri ve ilaçların (98-100), safra asiterinin (101), quinolin ve monohidroksiquinolin'lerin (102,103), azo boyalarının (104), sodyum benzoat ve sodyum nitratın (105), hava kirliliğini etmenlerinin (106-109), fabrika faaliyetleri sonucu oluşan kirliliğin (110-112) ve içeceklerdeki malik asit ve tartarik asit komplekslerinin ve içme sularının (113) mutajenitesi araştırılmıştır.



Öksüzoğlu (2000) çalışmasında, bazı bitki büyüme hormonlarının mutajenik etkilerini Salmonella / mikrozom sistemi ile araştırmıştır. TA 98 ve TA 100 mutant suşları ile S9 varlığında ve yokluğunda gerçekleştirilen çalışmada test edilen bitki büyüme hormonlarından Benziladenin sadece TA 98 suşunda ve S9 fraksiyonu varlığında zayıf mutajenik etki gösterdiğini rapor etmiştir (114). Charles ve ark. (2000) çalışmalarında 2,4-DB'nin tuzu olan Dimetilalanin'in genetik toksitesini, Ames testinde araştırmışlar ve 2,4-DB Dimetilalanin tuzunun; *Salmonella typhimurium* TA98, TA 100, TA 1535, TA 1537 ve TA 1538 suşlarında, S9 varlığında ve yokluğunda genotoksik açıdan bir potansiyel taşımadığını saptamışlardır (115).

Literatürde paraben ve esterlerinin toksisitesi üzerine çalışmalar daha çok endokrin sistem üzerine etkilerine odaklanmıştır. Metil ve propilparabenlerin mitokondri fonksiyonlarının kuvvetli inhibitörleri olmaları nedeniyle erkek infertilitesinde etkili olduğu bildirilmektedir (90). Parabenler östrojen yapısına benzerliğinden dolayı östrojen reseptörlerine bağlanarak endokrin sistem üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bununla birlikte in vitro ortamda insan meme kanser hücrelerinin büyümesini tetikledikleri de rapor edilmektedir. Propil ve butilparabenlerin erken çocukluk döneminde maruz kalınması ile erkeklerde fertilité üzerine olumsuz etkileri olabileceğine dair bilgiler de mevcuttur (88,89). Parabenler zayıf öströjenik aktivite göstererek MCF-7 insan meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını indüklediği belirlenmiştir. Bu durum parabenin insan deri hücrelerinde sitozolde bulunan sülfotransferaz aktivitesini inhibe etmesi sonucu östrojen düzeyinde görülen değişimler ile açıklanmıştır (85). Sülfotransferaz enzimleri östradiolün östrona dönüşümünü sağlayarak östrojen metabolizmasını düzenlemektedir. Bu enzimlerin inhibisyonu sonucu östrojen metabolizmasında aksamalara neden olmaktadır (92, 93). Bu çalışmada da parabenin mutajenik aktivitesi S9 (+) ve S9 (-) Ames testi ile Muta-ChromoPlate kiti kullanılarak araştırılmış ve belirli bir düzeyde mutajenik özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Çeşitli genotoksik çalışmalarda da parabenlerin genel olarak mutajenik olmadıkları belirtilmekle birlikte etil ve metil parabenlerin hamsterover hücrelerinde kromozomal anomalileri arttırdığı saptanmıştır (88).

Sonuç olarak, insanların kullanımına sunulan ksenobiyotiklerin mutajenitelerinin saptanmasında oldukça geniş bir uygulama alanı olan Ames testinin mutajenite tayininde ön değerlendirme açısından faydalı bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu

testlerin kullanımlarının yaygınlaşması ile bireylerin herhangi bir kimyasal ajana verecekleri genetik cevabın önceden belirlenmesi ve gerekli önlemlerin alınması sağlanabilecektir. Tıbbi araştırmalarda genotoksisite testlerinin yaygınlaştırılmasıyla insan sağlığı ve yaşam kalitesinin artması sağlanacaktır.



## 5. KAYNAKLAR

1. Özen, E. 2012. 1,4 Dioksan Verilen Albino Farelerde Yeşil Çayın Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Koruyucu Etkisi. Giresun Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, pp. 60, Giresun.
2. Korkmaz, B. 2005. Bazı 2-süstitüe Perimidin Bileşiklerinin Mutajenik aktivitelerinin Ames Mutajenite Testi ile Belirlenmesi. Anadolu Üniversitesi, Eskişehir.
3. Murray, R.K., Mayes P.A., Granner D.D.K., Rodwell, V.W. 1993. ed: Gülriz Mentş Harper'in Biyokimyası, s:811-917, Barış Kitabevi, İstanbul.
4. Temizkan, G.O. 1996. Moleküler Genetik, s:281, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
5. Barile, F.A. 2008. Principle of Toxicology Testing Chapter15, p:209-228. New York.
6. Choy, W.N. 2001, Genetic toxicology and cancer risk assessment. Marcel Dekker, 29-187 New York.
7. Young, R.R. 2002. Genetic toxicology. Toxicology 173: 103-21.
8. Mortelmans, K., Rupa, S.D., 2004. Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists. Adv Appl Microbiol 56: 379-401.
9. Zeiger, E. 2004. History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal. Environ Mol Mutagen 44: 363-71.
10. Bedir, A., Bilgici, B., Yurdakul, Z., Gürsel, B.Ş., Alvr, M. 2004. DNA hasarı analizinde  $\mu$ - FADU ve Comet yöntemlerinin karşılaştırılması. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2 (3): 97-103.
11. Vural, N. 2005. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları 115-129,
12. Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I. 2003. Indirect mechanisms of genotoxicity. Toxicol Lett 140-141: 63-74
13. Mateuca, R., Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volder, M. 2006. Chromosomal changes: induction, detection, methods, and applicability in human biomonitoring. Biochimie 88: 1515-31..
14. Murray, R. K., Mayes, P. A., Granner, D. K., Rodwell, U. W. 1996. Harper's Biochemistry, 799-806, Appleton&Lange pres,U.S.A.

15. Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., McFee, A.F., Wolff, S., Wassom, J.S. 1981. Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: A report of the U.S. EPA's Gene-Tox Program. *Mutat Res* 87: 143-88.
16. Brusick, D. 1987. Principles of genetic toxicology. Plenum Press 155-170, New York.
17. Wassom, J. 1992. Origins of genetic toxicology and the environmental Mutagen Society. *Environ Mol Mutagen* 14:1-6,
18. Kirkland, D.J. 1993. Genetic toxicology testing requirements: Official and unofficial views from Europe. *Environ Mol Mutagen* 21 (1): 8-14
19. Hrelia, P., Vigagni, F., Maffei, F., Morotti, M., Colacci, A., Perocco, P., Grilli, S., Cantelli-Forti, G. 1984. Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutat Res* 321 (4): 219-28.
20. Anderson, D. 1988. Human Biomonitoring. *Mutat Res* 204: 353-541.
21. Carrano, A.V., Natarajan, A.T. 1988. Consideration for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 204: 379-406.
22. Zeiger, E. 1998. Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance. *Regul Toxicol Pharmacol* 28: 85-95.
23. Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hugmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Suhaker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D. Aitio, A. 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463: 11-172.
24. Jena, G.B., Kaul, C.L., Ramarao, P. 2002. Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian Journal of Pharmacology* 34: 86-99.
25. Zeiger, E., Haseman, J.K., Shelby, M.D., Margolin, B.H., Tennant, R.W. 1990. Evaluation of four in vitro genetic toxicity tests for predicting rodent carcinogenicity: Confirmation of earlier results with 41 additional chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1: 1-14.
26. Demirel, S., Zamani, A. 2002. Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları. *Genel Tıp Dergisi* 12 (3): 123-27.

27. Olaharski, A., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M.E., Guzman, P., Mohar, A., Eastmond, D.A. 2006. Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis* 27: 3317-43.
28. Tice, R.R. 2000. Tek Hücre Jel / Comet Assay: in vitro ve in vivo Genetik Toksikoloji Testi Kuralları. *Çevre ve Moleküler Mutajenez* 35 (3): 206-21
29. Green, M.H., Lowe, J.E., Delaney, C.A., Green, I.C. 1996. Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damage in mammalian cells. *Methods Enzymol* 269:243-66.
30. Collins, A.R. 2004. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26(3):249-61.
31. Östling, O. Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123 (11): 291–298.
32. McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P., Collins, A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A european review. *Mutat Res*, 288: 47-63.
33. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
34. Dinçer, Y., Kankaya, S. 2010. DNA hasarının belirlenmesinde Comet assay. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 30 (4): 1365-73
35. Şekeroğlu, Z.A., V. Şekeroğlu, Z. The in vitro alkaline comet assay in genetic toxicology. *JABS*, 5 (13): 49-54011.
36. Çelik, A., Mazmanci, B., Çamlıca, Y., Çömelekoğlu, Ü., Aşkın, A. 2005. Evaluation of cytogenetic effects of lambda- Cyhalothrinon wistar rat bone marrow by gavage administration. *Environ Safe* 61: 128–133.
37. Yan Wang, Chang Xu, Li Qing Du, Jia Cao, Jian Xiang Liu, Xu Su, Hui Zhao, Fei-Yue Fan 1,2, Bing Wang 6, Takanori Katsube 6, Sai Jun Fan 1,2 and Qiang Liu 1,2,Int. J. Mol. Sci. 2013, 14(11), 22449-22461; doi:10.3390/ijms141122449
38. El-Zein, R., Vral, A., Etzel, C.J. 2011. Cytokinesisblocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* 26(1): 101-106.

39. Suspiro, A., Prista, J. 2011. Biomarkers of occupational exposure do anticancer agents: a minireview. *Toxicol Lett* 207(1):42-52.
40. Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, 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 (18): 4117-4121.
41. Doak, S.H., Liu, Y., Chen, C. 2012. Genotoxicity and Cancer. *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials 1st ed.*, Edited by Fadeel B, Pietroiusti A, Shvedova A. Academic Press pp. 243-261, USA.
42. Savage, J.R.K. 1993. Update on target theory as applied to chromosomal aberrations. *Env Mol Mutagen* 22: 198-207.
43. Norppa, H., Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Strömberg, U., Rössner, P., Boffetta, P., Lindholm, C., Gundy, S., Lazutka, J., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Sram, R.J., Knudsen, L.E., Barale, R., Fucic A. 2006. Chromosomal aberrations and SCE as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res* 600 (1-2): 37-45.
44. Evans, H.J. 1984. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests In: Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W., Ramel, C., eds., *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier Science 405–427, Amsterdam
45. Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M. 1987. Mammalian in vivo cytogenetic assays: Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutat Res* 189: 157–65.
46. Latt, S.A., Sehrek, R.R., Loveday, K. S., Dougherty, C. P., Schuler, C. F. 1980. Sister chromatid Exchange. *The American Journal of Human Genetics* 10: 267-331.
47. Latt, S.A., Schreck, R.R. 1980. Sister Chromatid Exchange Analysis. *The American Journal of Human Genetics* 32: 297-313.
48. Wolff, S. 1980. Sister Chromatid Exchange. *Adv. Human Genetic* 10:183-201.
49. Sonoda, E., Sasaki, M.S., Morrison, Yamaguchi-Iwai, C. Y., Takata, M., Takeda, S. 1999. Sister Chromatid Exchanges Are Mediated by Homologous Recombination in Vertebrate Cells. *Molecular and Cellular Biology* 19 (7):5166-5169.

50. <http://www.slideshare.net/medik.cz/ecology-practicals2>
51. Wolff, S. 1977. Sister chromatid exchange. *Annual Review of Genetics* 11: 183-201.
52. Bayel, İ. 2006. Terbinafin'in İnsan Lenfosit Kültürlerindeki Etkilerinin Kardeş Kromatid Değişimi (Sister Chromatid Exchange) Yöntemi İle İn Vitro Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 61 s, Mersin.
53. Üstün, F. 2007. Albendazol'un olası genotoksitesitesi üzerine askorbik asitin etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 100 s, İstanbul.
54. Atlı Şekeroğlu, Z., Şekeroğlu, V. 2011. Genetik toksisite testleri. *TÜBAV Bilim Dergisi* 4 (3): 221-229.
55. Taylor, J.H., Woods, P.S., Hughes, M.L. 1957. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine.
56. Perry, P.E., Thompson, E.J.1984. The methodology of sister chromatid exchanges. In: Kilbey B.J., Legator M.,Nichols W., Ramel C., eds. *Handbook of mutagenicity test procedures*, Elsevier Science, 495–529, Amsterdam.
57. Wilson, D.M., Thompson, L.H. 2007. Molecular mechanisms of sister-chromatid Exchange. *Mutat Res* 616: 11–23
58. Topaktaş, M., Speit, G. 1990. Induction of SCE and CA in human lymphocytes with prometryn. *Tr J Biol* 14: 69-78.
59. Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. 2010. *Sitogenetik*. Nobel Yayın Dağıtım, 87-91, Ankara.
60. Schmid, W.1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31: 9-15.
61. Widel, M., Kolosza, Z., Jedrus, S., Lukaszczyk, B., Raczek- Zwierzycka, K., Swierniak, A. 2001. Micronucleus assay in vivo provides significant prognostic information in human cervical carcinoma: The updated analysis. *Int J Radiat Biol* 77: 631-6.
62. Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R.1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneuploidic activity. *Mutat Res* 244: 95-103.

63. Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E., Van Hummelen, P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res* 392(1-2): 19-30.
64. Stopper, H., Müller, O.S. 1997. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A Minireview. *Toxicol In Vitro* 11: 661-67.
65. Karaman, A., Keskinler, F. 2009. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda genomik hasar. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 29 (6): 1392-97.
66. Vanparys, P., Vermeiren, F., Sysmans, M., Temmerman, R. 1990. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutat Res* 244: 95-103.
67. Cheng, T.J., Christiani, D.C., Xu, X., Wain, J.C., Wiencke, J.K., Kelsey, K.T. 1996. Increased micronucleus frequency in lymphocytes from smokers with lung cancer. *Mutat Res* 349: 43-50.
68. Duffaud, F., Orsiere, T., Villani, P., Pelissier, A.L., Volot, F., Favre, R., Botta, A. 1997. A comparison between micronucleated lymphocytes rates observed in healthy subject and cancer patients. *Mutagenesis* 12: 227-31.
69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9269328>.
70. <http://mutage.oxfordjournals.org/content/26/1/3/F1.expansion.html>.
71. Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J., Wurgler, F.E. 1998. Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res* 402(1-2): 203-209.
72. Maron, D. M., Ames, B. N. 1983. Revised methods for the mutagenicity test. *Mutat. Res* 113, 173-215.
73. McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc Nat Acad Sci* 72: 5135-39
74. Mortelmans, K., Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60
75. <http://www.openaccess.hacettepe.edu.tr/>
76. Gollapudi, B. B., Krishna, G. 2000. Practical aspects of mutagenicity testing strategy: an industrial perspective. *Mutation Research* 455, 21–28.



77. Ames, B.N., Lee, F.D., Durston, W.E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 70, 782-786.
78. Claxton, L.D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E., Zeiger, E. 1987. Guide for *Salmonella typhimurium* / mammalian microsome test for bacterial mutagenicity. Mutation Research 189, 83-91.
79. Levin, D. E., Yamasaki, E., Ames, B. N. 1982. Salmonella tester strain, TA 97 for the detection of frameshift mutagens. A run of cytosines as a mutational hotspot. Mutat. Res 94, 315-330.
80. <https://www.studyblue.com/notes/note/n/exam-4-hughes-genetics/deck/16046161>
81. Erdinger, L., Haack, T., Boche, G. 2001. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 of nitroses and respective hydroxylamine compounds. Mutation Research 491, 183-193.
82. [www.uzmanveteriner.com.tr/.../BİYOTRANSFORMASYON-%20İLAC%..](http://www.uzmanveteriner.com.tr/.../BİYOTRANSFORMASYON-%20İLAC%..)
83. Paolini, M., Forti, G.C. 1997. On the metabolizing systems for short-term genotoxicity assays: a review, Mutation Research, 387, 17-34.
84. Inami, K., Okazawa, M., Mochizuki, M. 2009. Mutagenicity of aromatic amines and amides with chemical models for cytochrome P450 in Ames assay. Toxicology in Vitro 23, 986-991.
85. Darbre P.D., Harvey P.W. 2008. Paraben esters: review of recent studies on endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure and discussion of potential human health risks. J appl Toxicol 28: 561-578.
86. [Stock-illustration-structural-chemical-formulas-of-parabens.html](http://stock-illustration-structural-chemical-formulas-of-parabens.html)
87. Nakagawa, Y., Moldeus, P. 1998. Biochem. Pharmacol. 55: 1907-1914
88. Final amended report on the safety assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as used in cosmetic products. Int J Toxicol. 2008;27:1-82.
89. Castelain, F., Castelain, M. 2012. Parabens: a real hazard or a scare story. European journal of dermatology EJD 22:723-7.

90. Crinnion, W.J. 2010. Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 15:190-6.
91. Kang, K.S., Che, J.H., Ryu, D.Y., et al. 2002. Decreased sperm number and motile activity on the F1 offspring maternally exposed to butyl p-hydroxybenzoic acid (butyl paraben). *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 64:227-35.
92. Ertüngealp, E., Seyisoğlu. H. 1996. Klimakterium ve menopoz. Kişnişçi H, Gökşin E, Durukan T, Üstay K, Ayhan A, Gürkan T, Önderoğlu L (Editörler). *Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi*. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi s. 1319-52
93. Cummings, S.R., Eckert, S., Krueger, K.A., Grady, D., Powles, T.J., Cauley, J.A., et al. 1999. The effect of Raloxifen on risk of breast cancer in postmenopausal women. Results from the MORE randomised trial. *JAMA* 181: 2189-97.
94. <http://edergi.marmara.edu.tr/marusbed/article/viewFile/5000003506/5000004020>
95. Omurtag G. Z., Arıcıoğlu, F. Şardaş, S., Oğuz, S. 2013. Mutajenik Karsinojenik Etkinin Ames Testi İle Araştırılması. *MÜSBED* 3(2):75-82
96. <http://www.ebpi-kits.com/Muta-chromoPlate%20Ames%20Reverse%20Mutation%20Test.pdf>
97. Bağcı, H., 1985. Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Yaz Okulu Moleküler Biyoloji Ders Notları.
98. Dökmeci, İ. 1988. Toksikoloji, Akut zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi 547, Nobel Kitap kitabevi, İstanbul.
99. Audrey, E., Et al. 1993. Genotoxic Activity detected in Soils From a Hazardous Waste site by the Ames test and an SOS colorimetric test. *Environmental and Molecular Mutagen* 220, 115-122.
100. Vargus, V.M.F., Motho, V.E.P., Henriques, J.A.P. 1993. Mutagenic Activity Detected by the Ames Test in River Water Under the Influence of Petro Chemical Industries. *Mut. Res* 319, 31-45.

101. Mori, Y., et al. 1991. Absence of Mutagenic Action of 5-B cholan 24 oic acid Derivatives in the Bacterial Fluctationand Standart Ames Tests, Mut. Res 262, 267-274.
102. Wiems, M.I., et al. 1992. Comparison of the Mutagenicity of quinoline and All Monohydroxy quinolines with a series of Areneoxide, trans dihydrodiolepoide, N-oxideandarenehydrate Derivatives of quinoline in theAmes/Salmonella/Microsome Test, Mut. Res 278, 277-286.
103. Vikse, R., et al. 1993. Mutagenic Activity of the Methly and Phenyl Derivatives of Food Mutagen 2 amino 3 methylimidazol (4.5.t) quinoxiline (I Q) in the Ames Test, Mut. res 298, 207-214.
104. İzbirak, A., Sümer, S., Diril, N. 1988. Gıdalara katılan Bazı Azo Boyalarının Mutajenik Etkilerinin Test edilmesi, IX-Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-23 Eylül, Bildiri.
105. Akın, A., Sümer S. 1989. Gıda Katkı Maddesi Olarak kullanılan Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitratın Salmonella/Microsome test Sisteminde Etkilerinin Araştırılması.Hacettep, Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi 10, 21-27.
106. Ong. T., Steward, J., Whong, W.Z. 1984. A simple Insitue Mutagenicity Test System for Detection of Mutagenic Air Pollution., Mut. Res.139, 177-181.
107. Krishna, G., Ong, T., Zwhans, W. 1983. (a7 Mutagenicity Studies of Ambient Airborne Particles I. Comparison of Solvents Systems, Mut. res. 124, 121-130.
108. Krishna, G., Nath, I., zwhans, W. 1983, (b) Mutagenicity Studies of Ambient Airborne Particles I. Comparison of Solvents Systems, Mut. Res. 124, 121-130.
109. Bağcı, H.,et al. 1992. Microbial Detection of Mutagens in filtrats of airborne particulates from Ankara. Doğa.Tr. J. Biol. 16(1) 33-58.
110. Krokje, A.,Tiltnes, A., Mylius, E. 1985. (a) The results of *Salmonella typhimurium* tests on expechorates from exposed workers. Mut. Res. 156, 147-152.
111. Krokje, A., Tiltnes, A., Mylius, E. 1988. Testingformutagens in an aluminium plant the results of *Salmonella typhimurium* test urine from exposed workers. Mut. Res. 204, 163-172.

- 112.** Yılmaz, Ö.k. Yureri, Bağcı H. 1992. Ankara civarındaki yüzeysel suların Ames mutajenite testi ile değerlendirilmesi, SKKD 2(1), 15-21
- 113.** Chang, T.L., Robert, P., Hanzimmer, S. 1988. The interaction of *aqueous solutions* of chlorinwithmaicacid, tartaricacidandvariousfruitjuics, a source of mutagens. Analyticaletters 21 (11), 2049-2067.
- 114.** Öksüzoğlu, E., Diril, N., Durusoy, M. 2000. Mutagenic effects of planth growth hormones with the Salmonella/microsome test and the SOS chromotest.Bull. Environ. Contam. Toxicol 65, 691-698.
- 115.** Charles, J. M., Cifone, M. A., Lawlor, T. E., Murli, H., Young, R. R., Leeming, N. M. 2000. Evaluation of the in vitro genetic toxicity of 4-(2,4-Dichlorophenoxy) butyricacid. MutationResearch 472: 75-83.



## ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Ordu'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ordu'da tamamladı. Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden 2013 yılında mezun oldu. Eylül 2013'de girdiği Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programını Ocak 2016'da tamamladı. 1 adet ulusal bilimsel toplantılarda sunulan bildirisi vardır. 1 adet Giresun Üniversitesi BAP birimi destekli projesi bulunmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.

