

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

**BAZI BENZİL TÜREVLERİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*' DE
MUTAJENİK VE REKOMBİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Eşref DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2006

**BAZI BENZİL TÜREVLERİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*' DE
MUTAJENİK VE REKOMBİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Eşref DEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez, 2006.02.0121.002 proje numarası ile Akdeniz Üniversitesi Bilimsel
Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.**

2006

**BAZI BENZİL TÜREVLERİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*' DE
MUTAJENİK VE REKOMBİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Eşref DEMİR

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

2006

**BAZI BENZİL TÜREVLERİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*' DE
MUTAJENİK VE REKOMBİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Eşref DEMİR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Bu tez, 28 / 12 / 2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Doksanbeş (95) not
takdir edilerek Oybirliği ile kabul edilmiştir.**

Doç. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

ÖZET

BAZI BENZİL TÜREVLERİNİN *DROSOPHILA MELANOGASTER*'DE MUTAJENİK VE REKOMBİNOJENİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Eşref DEMİR

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Bülent KAYA

Aralık 2006, 78 Sayfa

Bu çalışmada, *Drosophila melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile bazı benzil türevlerinin (Benzaldehit, Benzil asetat, Benzil alkol ve Benzoik asit) etkileri araştırılmıştır. Benzil türevleri gıdalarda ve içeceklerde lezzet vermek amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için, genomlarında çekinik flare (*flr*³) ve çoklu kanat kılı (*mwh*) genlerini taşıyan üçüncü evre transheterozigot larvalar söz konusu benzil türevlerinin altı farklı konsantrasyonu (0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM) ile kronik olarak beslenmiştir. Söz konusu kimyasalların genotoksik etkileri, larvaların imajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişimlerin (nokta mutasyon, parça kopması, ayrılmama ve rekombinasyon) sonucunda oluşan mutant trikomlara göre değerlendirildi. Değerlendirme, Graf ve arkadaşları tarafından (1984) belirtilen sınıflandırma (küçük tek tip, büyük tek tip, ikiz, *mwh* ve toplam klonlar) esas alınarak yapıldı.

Trans-heterozigot kanatlarda Benzaldehit 1, 10, 25 ve 50 mM konsantrasyonlarda küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için pozitif sonuçlar gösterirken, Benzil asetat ise 10, 25 ve 50 mM konsantrasyonlarda pozitif sonuçlar göstermiştir. Öte yandan balansır-heterozigot kanatlarda ise Benzaldehit'den 25 ve 50 mM konsantrasyonlarda küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için pozitif sonuçlar elde edilirken, Benzil asetat ise 0.5 ve 50 mM konsantrasyonlarda sadece büyük tek tip klonlarda pozitif sonuçlar elde edilmiştir.

Benzil alkol ve Benzoik asit trans-heterozigot kanatlarda 50 mM konsantrasyonda küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için pozitif sonuçlar göstermiştir. Hâlbuki balansır-heterozigot kanatlarda ise Benzil alkol 1, 10 ve 50 mM konsantrasyonlarda büyük tek tip klonlar için pozitif sonuçlar gösterirken, Benzoik asit ise tüm konsantrasyonlarda ya negatif ya da istatistiksel olarak anlamsız sonuçlar vermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan kimyasalların yüksek derişimlerinin *Drosophila melanogaster*'de mutasyon ve/veya rekombinasyon oluşumuna neden olduğu saptanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Drosophila melanogaster*, somatik mutasyon, mitotik rekombinasyon, somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART), Benzil Türevleri

JÜRI: Doç. Dr. Bülent KAYA (Danışman)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

ABSTRACT

INVESTIGATION OF MUTAGENIC AND RECOMBINAGENIC EFFECTS OF SOME BENZYL DERIVATIVES IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Eşref DEMİR

M S. Thesis in Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Bülent KAYA

December 2006, 78 Pages

In this study, the effects of some benzyl derivatives (Benzaldehyde, Benzyl acetate, Benzyl alcohol and Benzoic acid) were investigated in the somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster* (SMART). Benzyl derivatives are the food additives which are used for increasing the taste of food and beverages. In SMART test, 3-day old larvae trans-heterozygous for the third chromosome recessive markers flare (*flr*³) and multiple wing hair (*mwh*) were reared using the medium containing with six distinct concentrations (0.1, 0.5, 1, 10, 25 and 50 mM) of such benzyl derivatives. The effects of these chemicals were evaluated according to genetic changes (point mutation, deletion, non-disjunction and recombination) in wing imaginal disc cells that lead to the formation of mutant trichomes. Classification was based on the classification (small single spot, large single spot, twin spot, multiple wing hair and total spot) developed by Graf et. al. (1984).

In this study, Benzaldehyde demonstrated in trans-heterozygous flies (*mwh/flr*³) positive results for small single spots, total *mwh* spots and total spots in 1, 10, 25 and 50 mM exposure concentrations while Benzyl acetate demonstrated positive results for small single spots, total *mwh* spots and total spots in 10, 25 and 50 mM exposure concentrations. On the other hand, Benzaldehyde obtained in balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) positive results for small single spots, total *mwh* spots and total spots in 25 and 50 mM exposure concentrations while Benzyl acetate obtained positive results for only large single spots in 0.5 and 50 mM exposure concentrations.

Benzyl alcohol and Benzoic acid demonstrated in trans-heterozygous flies (*mwh/flr*³) positive results for small single spots, total *mwh* spots and total spots in 50 mM exposure concentration. Whereas, Benzyl alcohol demonstrated in balancer-heterozygous flies (*mwh/TM3*) positive results for large single spots in 1, 10 and 50 mM exposure concentrations while Benzoic acid demonstrated either negative or inconclusive results for all concentrations.

Consequently; high used concentrations of these chemicals which used in this study did cause formation of the mutation and/or recombination in *Drosophila melanogaster*.

KEY WORDS: *Drosophila melanogaster*, somatic mutation, mitotic recombination, somatic mutation and recombination test (SMART), Benzyl Derivatives

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Bülent KAYA (Advisor)

Prof. Dr. Atila YANIKOĞLU

Prof. Dr. Beria FALAKALI MUTAF

ÖNSÖZ

Besinleri bakteri, küf, maya bozulmalarından korumak, raf ömrünü uzatmak, lezzet vermek, doğal renk ve aromayı korumak amacıyla gıdalarda birçok gıda katkı maddesi kullanılmaktadır. Ancak bu maddelerin insan sağlığını olumsuz yönde etkilediği de bir gerçektir. Her geçen gün yenileri üretilerek piyasaya sürülen gıda katkı maddelerinin canlılar üzerindeki zararlı etkileri birçok araştırmacı tarafından belirlenmeye çalışılmaktadır. Bilim adamları, araştırmaları sonucunda elde ettikleri bulgular ışığında bu maddelerin bilinçli kullanımı konusunda ilgilileri bilgilendirmeye çalışmaktadırlar.

Gıda katkı maddeleri, tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da 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 kullanılan maddelerdir.

Benzil türevleri gıdalarda ve içeceklerde lezzet vermek amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. Gıda katkı maddelerinin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri egzama, astım, baş ağrısı, migren, davranış bozuklukları, uyku problemleri, alerjik kaşıntılar, ürtiker, anjioödem, ishal (özellikle çocuklarda), hiperaktivlik, depresyon ve kanserdir. İnsan populasyonları arasında kanserin meydana gelişindeki geniş varyasyonlar, kanser oluşumunda çevresel faktörlerin kalıtsal faktörlerden daha önemli olduğunu göstermektedir. Çeşitli mutasyonlar ve mitotik rekombinasyonun da belirli tip insan kanserlerinin gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülürse oldukça fazla kullanım alanına sahip benzil türevlerinin somatik mutasyon ve mitotik rekombinasyona etkileri bakımından yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Canlı sistemde çeşitli kimyasalların etkisiyle hangi genetik hasarların ne kadar oluştuğunu belirlemek için gerek prokaryotik gerekse ökaryotik model

organizmalar çeşitli testlerde kullanılmaktadır. Genetik hasarın belirlenmesi için yapılan testlerin birçoğu *in vitro* koşullardadır. Hâlbuki *in vivo* testler organizmanın bütünlüğü içinde olduğunda daha büyük bir önem taşımaktadır. Mutasyon ve rekombinasyona yol açan kimyasalların belirlenmesinde en yaygın kullanılan *in vivo* testlerden birisi de *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART)'dir. Bu çalışmada, son yıllarda genetik çalışmaların vazgeçilmez materyali ve ökaryotik bir organizma olan meyve sineği (*Drosophila melanogaster*) kullanılmıştır. *In vivo* koşullarda *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi uygulanarak 4 (dört) Benzil türevinin mutajenik ve rekombinojenik etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamız sonucunda elde edilen bulguların, gıda katkı maddelerinin gıda sanayinde kullanılmasının ve tüketici tarafından tüketiminin bilinçli bir şekilde olmasına yardımcı olacağına ve bilim dünyasına katkı getireceğine inanılmaktadır. Yapılan bu çalışmanın gelecekte bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutmasını dilerim.

Bana bu konuda çalışma olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın yürütülmesi sırasında her konuda en içten ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm ve bu tezin her aşamasında bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren Akademik Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Bülent KAYA'ya, yardımlarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Nuray KAYA'ya, *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi konusunda, istatistiksel analizlerde ve tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Sayın Arş. Gör. Serap KOCAOĞLU'na, her türlü konuda yardımlarını aldığım Sayın Arş. Gör. Yusuf KURT'a, Sayın Arş. Gör. Hüseyin ÇETİN'e, Sayın Arş. Gör. Özge TUFAN'a ve Biyoloji Anabilim Dalı'ndaki çalışma arkadaşlarıma ve ayrıca tez çalışmamın başından beri maddi ve manevi varlıklarıyla en zor anlarımda her zaman yanımda bulunan ve bulunacak olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Aralık 2006, Antalya

Eşref DEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve METOD	13
2.1. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Yaşam Döngüsü	13
2.2. Kullanılan Hatların Genetik Yapısı	18
2.3. <i>Drosophila</i> Hatlarının Kültürü	21
2.4. Deney Grupları	22
2.5. Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi	24
2.6. Benzil Türevlerinin Uygulanması	25
2.7. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması	26
2.8. Kanat Preparatlarının Mikroskoptaki Analizi	28
2.9. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması	33
2.10. Verilerin Değerlendirilmesi	34
3. BULGULAR	35
3.1. <i>D. melanogaster</i> Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Kullanılarak Mutajenite ve Rekombinojenitenin Belirlenmesi	35
3.1.1. Kontrol Grupları	35
3.1.1.1. Distile Su ve Etil metan sülfonat (EMS)	35
3.1.2. Benzil Türevleri	36
3.1.2.1. Benzaldehit	36
3.1.2.2. Benzil asetat	40
3.1.2.3. Benzil alkol	44
3.1.2.4. Benzoik asit	48
4. TARTIŞMA	52
5. SONUÇ	62

6. KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Bd ^S	Beaded Serrate
cm	Santimetre
flr	Flare
g	Gram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MÖ	Milattan Önce
mwh	Multiple wing hair
W ⁱ	White ivory

Kısaltmalar

EMS	Etil Metan Sülfonat
SCE	Sister Chromatid Exchange (Kardeş Kromaidlerde Parça Değişimi)
SMART	Somatic Mutation and Recombination Test (Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi)
CAS	Chemical Abstract Service
GKM	Gıda Katkı Maddeleri
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi)
FDA	Food and Drug Administration (Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)
ADI	Acceptable Daily İntake (Kabul Edilebilir Günlük Alım Düzeyi)
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level (Toksik etki gözlenmeyen düzey)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
Bkz	Bakınız

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Drosophila</i> kanat somatik. mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi	14
Şekil 2.2. <i>Drosophila melanogaster</i> 'in hayat döngüsü	16
Şekil 2.3. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki pozisyonları.....	17
Şekil 2.4. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne flare ne de mwh olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) mwh trikomlar d) flare genotipe ait trikomlar	18
Şekil 2.5. Flr^3 / TM3, Bd^S bireylerindeki homozigot letal etkiler.....	19
Şekil 2.6. Dengeleyici kromozom taşımayan normal ve dengeleyici kromozom taşıyan Bd^S bireylerinin kanat fenotipleri.....	20
Şekil 2.7. <i>Drosophila</i> kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri.....	20
Şekil 2.8. Dengelenmiş heterozigot mwh/Bd^S ve transheterozigot mwh/flr^3 bireylerin elde edilebilmesi için mwh/mwh ve $flr^3/TM3$, Bd^S bireyleri arasındaki çaprazlamalar	25
Şekil 2.9. Kanat sektörlerinin şematik görünümü.....	28
Şekil 2.10. Büyük tek tip mwh mutant klonların görünümü.....	30
Şekil 2.11. Küçük tek tip mwh mutant klonların görünümü.....	30
Şekil 2.12. İkiz mutant klonların görünümü	31
Şekil 2.13. Büyük tek tip flr mutant klonların görünümü	31
Şekil 2.14. mwh/flr^3 genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anomaliler	32
Şekil 3.1. Benzaldehit'in (normal kanat) klon frekans dağılımı	39
Şekil 3.2. Benzaldehit'in (serrat kanat) klon frekans dağılımı.....	39
Şekil 3.3. Benzil asetat'ın (normal kanat) klon frekans dağılımı.....	43
Şekil 3.4. Benzil asetat'ın (serrat kanat) klon frekans dağılımı	43
Şekil 3.5. Benzil alkol'ün (normal kanat) klon frekans dağılımı	47
Şekil 3.6. Benzil alkol'ün (serrat kanat) klon frekans dağılımı	47
Şekil 3.7. Benzoik asit'in (normal kanat) klon frekans dağılımı.	51
Şekil 3.8. Benzoik asit'in (serrat kanat) klon frekans dağılımı.....	51

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan Benzil türevleri.....	23
Çizelge 2.2. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi.....	34
Çizelge 3.1. Benzaldehit'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	37
Çizelge 3.2. Benzaldehit'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	38
Çizelge 3.3. Benzil asetat'ın <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	41
Çizelge 3.4. Benzil asetat'ın <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	42
Çizelge 3.5. Benzil alkol'ün <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	45
Çizelge 3.6. Benzil alkol'ün <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	46
Çizelge 3.7. Benzoik asit'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	49
Çizelge 3.8. Benzoik asit'in <i>Drosophila melanogaster</i> 'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri.....	50

1. GİRİŞ

Beslenme, insanoğlunun yaşantısında vazgeçilmez önemli bir unsurdur. Dünya üzerindeki her canlı bilinçli veya bilinçsiz beslenme uğraşı vermektedir. Çağımızda beslenme insanoğlu için sadece karın doyurma olgusu olmaktan çıkmış daha bilinçli bir hale gelmiştir. Ekonomik gelişmeyle birlikte yaşam biçimindeki hızlı değişime paralel olarak, toplumların beslenme şekilleri ve tüketici beklentileri değişmektedir. Tüketiciler güvenli ve kaliteli gıdalar tüketmek istemekte ve bu beklentileri karşılamak üzere gıda üretim zincirinde geleneksel uygulamalar yerini yeni sistemler ve yöntemlere bırakmaktadır.

Günümüzde besinlerin üretim ve tüketim ilişkileri gıda katkı madde (GKM)'lerinin kullanımını teknolojik bir zorunluluk olarak ortaya koymaktadır. Endüstrinin gelişmesi ile besin üretiminin ve işlenmesinin artması GKM'lerinin kullanımını da artırmıştır. Ev dışında çalışanların artması, beslenme alışkanlıklarının değişmesi, besin hazırlama için az zaman kalması veya besin hazırlama için az vakit harcama isteği yarı-hazır veya tamamen ticari olarak hazırlanmış olan besin üretimini teşvik etmiş, bu da GKM kullanımını kaçınılmaz kılmıştır (Briggs 1997).

GKM, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde (Türk Gıda Kodeksi 16 Kasım 1997): “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham ya da 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 kullanılan maddelerdir” şeklinde tanımlanmaktadır.

GKM'lerin kullanılması ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, M.Ö. 3000 yıllarında et ürünlerini kürelemede tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında ise tuz ve odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldıkları görülmektedir. Ortaçağlarda etlere koruyucu amaçla tuz ve tütsünün yanı sıra katılan nitratin etin rengini olumlu yönde değiştirmek ve *Clostridium botulinum* bakterisinin neden olduğu

botulizm hastalığını önlemek amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Baharatlardan, M.Ö. 50 yıllarında lezzet verici olarak yararlanılmıştır. Gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmışlardır. Yapay boyaların sentezi ise 1856 yılında olmuştur. Katkı maddelerinin 19. yy. daki kullanımları, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup günümüzde ise bu maddeler gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır (Altuğ 1999).

Son yıllarda, gıda güvenliği konusunda en çok tartışılan konulardan birisi de her gün tükettiğimiz gıdalarda bulunan katkı maddeleridir. Gıda katkı maddelerini hepimiz her zaman her yerde tüketiyoruz. Sağlıklı beslenmeye özen gösterdiğini söyleyen kişiler bile bir kap meyveli yoğurt ya da kuru meyve yerken birtakım kimyasal maddeleri de beraberinde tüketiyor. Yaklaşık olarak yiyecek ve içeceklerde kullanılan 340 GKM varken, aroma maddelerinin sayısı 1700 civarındadır (Thomas 1988). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde çeşitli amaçlarla kullanılan 300 civarında GKM yer almaktadır. Bunlar JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-Gıda Katkıları FAO/WHO Ortak Uzmanlar Komitesi) ve FDA (Food and Drug Administration-Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi)'nin çalışma sonuçlarına göre düzenlenmiştir.

Gıda katkı maddeleri, gıda üretiminde 32 değişik amaçla kullanılmaktadır (Kotsonis vd. 2001). Bu kullanım amaçlarından bazıları ve değişik GKM'leri aşağıda gösterilmiştir.

Bazı Gıda Katkı Maddeleri ve Kullanım Amaçları:

1.Kaliteyi koruyarak raf ömrünü uzatanlar (Koruyucular)

- a. Antimikrobiyaller (nitrit, benzoik asit, sorbik asit, kükürt dioksit)
- b. Antioksidanlar (BHA, BHT, propil gallat)

2. Hazırlama ve pişme özelliğini geliştirenler

- a. pH ayarlayıcılar (asetik asit, propionik asit, kalsiyum karbonat)
- b.Topaklanmayı önleyenler (magnezyum oksit, magnezyum karbonat, silikon dioksit)

- c. Emülsiyon yapıcılar (lesitin, mono ve digliseritler)
- d. Stabilizörler, kıvam arttırıcılar (kalsiyum asetat, kalsiyum karbonat)

3. Aroma, lezzet, tad ve renk geliştiriciler

- a. Lezzet vericiler (aroma maddeleri)
- b. Lezzet arttırıcılar (MSG, inositol)
- c. Renklendiriciler (tartarazin, kurkumin, annotto, β -karoten)
- d. Yapay tadlandırıcılar (aspartam, sakarin, asesulfam K, neoherperidin DC)

Gıda katkı maddeleri insanların karşılaştığı kimyasallar içerisinde çok önemli bir gruptur. İnsanlar bu maddelere doğuştan ölüme kadar kendi iradeleri dışında maruz kalabilmektedirler. Katkı maddelerini içeren gıdaları milyonlarca kişinin tükettiği düşünülürse, yapılan en ufak hatanın insan sağlığı ile ilgili büyük sorunlar yaratacağı açıktır. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin kullanım izni uluslararası ve ulusal sağlık kuruluşlarının yoğun ve dikkatli incelemesi sonucunda verilir. Besinlere katılacak katkı maddesinin maksimum miktarlarının belirlenmesi için katkı maddesinin ADI (Acceptable Daily Intake = günlük alınabilecek miktar) değerinin bilinmesi gereklidir. Katkı maddesinin ADI değeri toksikolojik testlerle saptanır. Çalışmalar sonunda katkı maddesinin hiç bir etkisinin bulunmadığı bir doz elde edilemezse katkı maddesinin besinlere katılmasına izin verilmez. Ancak deney hayvanında olumsuz etki göstermeyen bir doz elde edilirse, bu doz “etkisiz doz“ veya NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) olarak tanımlanır. Fakat bu doz deney hayvanının vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak saptanmış bir dozdur ve insandaki etkileri bilinmemektedir. Deneysel araştırmalar insanlar üzerinde etik nedenlerle yapılamayacağından, güvenlik faktörü kullanılır. Güvenlik faktörü genellikle 100’dir. Yani deney hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun 1/100’ü insan için güvenlik faktörü olarak kabul edilir (ADI=NOAEL/100). Böylece günlük alınabilecek miktar, insanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak belirlenir. Günlük maksimum alım ise ADI değeri ile vücut ağırlığının çarpılması şeklinde saptanır (Gürçan 1993, Renwiek 1995, <http://www.saglikvakfi.org.tr/html/gkmy.asp?id=58>).

Son 30 yıldır gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, yiyecek maddelerinde kullanılan katkı maddelerinde tam bir patlama olmuştur. Örneğin, sadece İngiltere’de

bir yıl içinde kullanılan katkı maddelerinin toplam ağırlığının iki yüz bin tonu geçtiği sanılıyor. Gıda katkı maddelerinin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri egzama, kurdeşen, astım, baş ağrısı, davranış bozuklukları, uyku problemleri, alerjik kaşıntılar, ürtiker, anjioödem, gastrik rahatsızlıklar, ishal (özellikle çocuklarda), hiperaktiflik, ve aşırı duyarlılık (hypersensitivity), kanser, depresyon, migren ve benzeri durumlardır (Güneşli 2000, Küçükusta 2003). Kullanılmasına izin verilen gıda katkı maddelerinin sürekli olarak alındığında toksik, genotoksik ve kanserojenik etkiler gösterdikleri bilinmektedir (Briggs 1997).

Gıda katkı maddelerinin önemli bir grubu olan koruyucuların genotoksik potansiyele sahip olduğu farklı çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, Ramirez ve arkadaşları (2001), gıdalarda koruyucu olarak kullanılan sodyum nitrit'in genotoksik etkiye sahip olduğunu saptamıştır. Kronik uygulamalarda sodyum azid'in genotoksik etkisinin olduğu da somatik mutasyon ve rekombinasyon (SMART) testi ile gösterilmiştir (Gonzales-Cesar ve Ramos-Morales 1997). Ebringer ve arkadaşları (1982), iki nitröz madde içeren gıda koruyucusunun mutajenik etkisini incelemiş ve 5-NFAA [3-(5-nitro-2-furyl) acrylic acid]'nın mutajenik olduğunu bulmuşlardır. Gıdalarda koruyucu amaçla kullanılan antioksidanlardan bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve bütillenmiş hidroksitoluen (BHT)'in akciğer ve karaciğerde tümöre neden olabileceği ifade edilmiştir (Ertuğrul 1998). Diğer taraftan yapılan bir başka çalışmada ise, bütillenmiş hidroksianisol ve bütillenmiş hidroksitoluenin kanserojenik etkiler göstermedikleri aksine gıdalarda izin verilen miktarlarda kullanıldığında antikanserojenik olabileceği ifade edilmiştir (Williams vd 1999). Besinleri bakteri, küf, maya bozulmalarından korumak, raf ömrünü uzatmak, doğal renk ve aromayı korumak amacıyla kullanılan koruyucu katkı maddelerinden en çok tartışılanları nitrit ve nitratlardır. Nitrit ve nitratlar kansere neden olan nitrozaminleri oluştururlar. Kanın oksijen taşıma yeteneğini azaltırlar (Yurttagül, 1993). Nitrozaminler genotoksik karsinojenlerdir. Nitrozamin bileşiklerinden biri olan Nitrosodisikloheksilamin (N-NO-DCHA)'in genotoksik potansiyeli V79 Çin kobay hücrelerinde (V79 Chinese hamster cells) kardeş kromatidlerde parça değişimi (Sister Chromatid Exchange; SCE) testi ile

araştırılmıştır. SCE analizinde, N-NO-DCHA'nın kardeş kromatidlerde parça değişimini uyardığı bulunmuştur (Gebel vd 2001).

Gıda katkı maddelerinden aroma arttırıcılar ise aromayı daha cazip hale getirmek, orijinal tad ve kokuyu korumak, düzeltmek veya arttırmak amacıyla kullanılır (Briggs 1997, Thomas 1988). Ohguro ve arkadaşlarının (2002) yaptıkları bir çalışmada, bazı gıdalarda aroma arttırıcı olarak kullanılan monosodyum glutamat (MSG; E 621)'ın gözlere zarar verdiği bildirilmiştir. Farelere çeşitli miktarda monosodyum glutamat verdiklerinde bu maddenin retinadaki (ağtabaka) hücreleri etkilediğini ve farelerin görme yeteneğini azalttığını tespit etmişlerdir.

Yapay tatlandırıcı olarak kullanılan aspartam üzerine yapılan bir çalışmada ise, aspartamın; baş ağrısı, davranımsal ve bilinçsel değişiklikler, duygu durum değişiklikleri ve duyarlı bireylerde alerjik reaksiyonlar gibi bazı yan etkileri bildirilmiştir (Butchko vd 2002). Aspartam'a ait zarar verici etkilerin kaynağının formaldehit oluşumuna katkısı olabileceği de belirtilmiştir (Trocho vd 1998). Yapılan diğer bir çalışmaya bakıldığında aspartam, *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 hatları kullanılarak yapılan *in vitro* mutajenite (Ames) testinde mutajenik değilken, insan lenfositleri kullanılarak yapılan çalışmada mikronükleus oluşumunu uyarmıştır (Rencuzoğulları vd 2004). Mukherjee ve Chakrabarti (1997)'nin yaptıkları bir çalışmada birçok gıda maddesinde yapay tatlandırıcı olarak kullanılan Asesulfam-K'nın *in vivo* çalışmalarda genotoksik ve klastojenik potansiyeli değerlendirilmiştir. Asesulfam-K'nın doza bağlı olarak klastojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Katkı maddeleri arasında en çok kullanılanları boya maddeleridir. Çok eski zamanlardan beri çeşitli besinlere boya maddeleri katılmaktadır. Boya katkı maddeleri gıdaların görünüşünü değiştiren ve düzelten maddelerdir. Teknoloji gereği yapılan işlemler sırasında ürünün orijinal rengi kaybolmuş olabilir. İşlendiği ham maddeden gelen bir takım renk farklılıkları gözlenebilir, depolama sırasında bir takım renk kayıpları olabilir. Bu gibi sorunların önüne geçmek, ürünün görünüşünü düzeltmek, daha parlak ve çekici renkler elde etmek amacıyla boya katkı maddeleri kullanılmaktadır (Güneşli 2000). Gıda boyalarından tartrazin'in genotoksik etkisi ise

Drosophila'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırılmış ve tartrazinin hem mutajenik hem de rekombinojenik etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Niraj vd 1989). Ayrıca tartrazin, egzama, migren ve astım gibi aşırı duyarlılık reaksiyonlarına da sebep olabilmektedir (Ertuğrul 1998). Macioszek ve Kononowicz (2004) gıdalarda renklendirici olarak kullanılan Kinolin Sarısı (Quinoline Yellow; E 104) ve Parlak Siyah (Brilliant Black; E 151)'in genotoksik etkilerini tek hücre jel elektroforezi tekniği (Single cell gel electrophoresis=COMET) ve mikronükleus testleriyle göstermişlerdir.

Gıda maddesi üretilirken uygulanan bazı teknolojik işlemler lezzet kaybına neden olur. Bu nedenle mevcut tat ve kokunun zenginleştirilmesi ve daha hoş ve çekici hale getirilmesi lezzet maddelerince sağlanır. Gıdalara lezzet vermek amacıyla benzil türevleri kullanılmaktadır. USA'da tüketilen otuz yedi (37) benzil türevinin yıllık toplam miktarı yaklaşık olarak 464,110 kg'dır (NAS 1970, 1982, 1987, Lucas vd 1999). Gıdalara lezzet vermek amacıyla gıda katkı maddesi olarak kullanılan bu 37 benzil türevinin 30'u gıdalarımızda doğal olarak da bulunmaktadır. Örneğin, birçok meyvede (elma, avokado, böğürtlen, yaban mersini, kiraz, kavun, erik, çilek), sebzelerde (enginar, fasulye, lahana, mısır, pırasa, mantar, patates, domates), etlerde (sığır eti, pişkin domuz eti, kabuklu balıklar), çaylarda ve şaraplarda benzil türevleri doğal olarak bulunmaktadır (Maarse vd 1999).

Bu çalışmada kullanılan benzil türevlerinin farklı etkileri *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri ile çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Test sistemlerinin ve test sistemlerinde çalışılan organizmaların farklı olmasından dolayı elde edilen sonuçlar negatif, pozitif, zayıf pozitif ve belirsiz olmak üzere çeşitlilik göstermektedir (Adams vd 2005).

Benzil asetat Ames testi (*S. typhimurium*'un TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılmıştır) ve kromozom hasarı testinde negatif sonuçlar verirken, fare lenfoma L5178Y hücrelerinde ve insan lenfositlerinde somatik mutasyonları; *Bacillus subtilis* H17 ve M45 hatlarında ise rekombinasyonu indüklediği yapılan *in vitro* genotoksisite çalışmalarda gösterilmiştir (Mortelmans vd 1986, Schunk vd 1986, Florin vd 1980, Galloway vd 1987, Matsouka vd 1996, Caspary vd 1988, Yoo 1986). Farelerdeki çalışmalarda karaciğer ve ön mide tümörlerinin, erkek sıçanlarla yapılan

Çalışmalarda ise pankreas asinar hücre kanserinin yükseldiği gözlenmiştir. İnsanlarda kanserojeniteye ait bir veri elde edilemezken, deney hayvanlarıyla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda ise sınırlı kanıtlar bulunmuştur. Bu kanıtlar karaciğer kanserindeki artış, özellikle adenoma ve nmidenin skuamous hücre neoplazmalarıdır (NTP, 1986). *İn vivo* yapılan çalışmalar rneğin *Drosophila* da eşeeye bağlı resesif letal mutasyon testi (SLRL), mikronükleus testi ve kardeş kromatid değişikliği testinde negatif sonuçlar elde edilmiştir (NTP 1993 a, Foureman vd 1994, Shelby vd 1993).

Benzoik asit Ames testinde (*S. typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları kullanılmıştır) negatif sonuçlar göstermesine karşın, *B. subtilis* H17 ve H45 hatlarını kullanarak yapılan rekombinasyon testinde rekombinasyonu uyarmıştır. Çin kobaylarının fibroblast hücreleri (Chinese hamster fibroblast cells) kullanılarak yapılan kromozom hasarı testinde ise kromozom hasarlarını artırdığı gözlenmiştir (Zeiger vd 1988, Rapson vd 1980, Nonaka 1989, Ishidate vd 1984).

Benzil alkol ile ilgili yapılan çalışmalarda ise, *in vitro* Ames testinde (*S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538 suşlarında) negatif sonuçlar vermiştir. *İn vitro* bir çalışma olan rekombinasyon testinde *B. subtilis* H17 ve M45 suşlarında rekombinasyonu indüklemiştir. Çin kobaylarının yumurtalık hücreleri kullanılarak yapılan kromozom hasarı testinde kromozomlarda hasarlara neden olurken, kardeş kromatid değişikliği testinde ise, Çin kobaylarının yumurtalık hücrelerinde zayıf pozitif etkiler göstermiştir (Heck vd 1989, NTP 1989, Yoo 1986, Anderson vd 1990). Diğer taraftan, *Drosophila*'da eşeeye bağlı resesif letal mutasyon testi ve fare kemik iliği hücreleri kullanılarak yapılan mikronükleus testinde negatif sonuçlar vermiştir (Foureman vd 1994, Hayashi vd 1988).

Benzaldehit ise, *in vitro*'da fare L5178Y lenfoma hücrelerinde somatik mutasyonları, Çin kobay hücreleri kullanılarak yapılan kromozom hasarı testinde kromozom bozukluklarını indüklemiştir (McGregor vd 1991, Sofuni vd 1985). *İn vivo* da ise *Drosophila*'da eşeeye bağlı resesif letal mutasyon testinde negatif sonuç vermiştir (Woodruff vd 1985). Sıçanlarla yapılan toksisite çalışmalarda Benzaldehit uygulanan

sıçanlarda böbrek tübüler epitelyal dejenerasyonu, karaciğer dejenerasyonu, ön mide de hiperplazi, hiperkeratoz ve beyincikte nekroz gözlenmiştir. (NTP, 1990 a, b).

Kullanım alanlarının fazla olması, benzil türevlerinin genotoksikolojik etkilerinin daha ayrıntılı olarak bilinmesi gereğini doğurmuştur. Günümüzde çeşitli organizmalar kullanılarak genotoksisite çalışmaları yapılmaktadır. Genetik toksisite çalışmalarında kullanılan test sistemlerinin her biri farklı genetik kusurları tespit etmek amacıyla geliştirilmiştir. Gen mutasyonlarının taranmasında bakteriyel test sistemleri (Mortelmans ve Zeiger 2000, Ruiz ve Marzin 1997), *in vitro* memeli hücre kültürleri (Mortelmans ve Zeiger 2000) ve ökaryotik maya ile *Drosophila* test sistemlerinin kullanılması önerilirken kromozom hasarlarının belirlenmesinde *in vitro* sitogenetik testler, *in vivo* kemirgen kemik iliği kromozom hasarı ve mikronükleus testleri, dominant letalite testi ve germ hücre kromozom aberasyon testlerinden yararlanılmaktadır (Brusick 1987).

Ökaryotik bir organizma olan *Aspergillus nidulans* genetik testlerde çok yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır. Fungal genetik sistem, kromozom kaybı ve ayrılmama, mitotik krossing-over ve belirli tip kromozom hasarlarının belirlenmesinde hassastır (Crebelli vd 1986). Bitkilerin model organizma olarak seçildiği testlerde mitoz ve mayoz bölünmeler sırasında oluşan mutasyonlar tespit edilebilmektedir (Povolotskaya 1961, Evans ve Scott 1964, de Serres ve Shelby 1978, Constain ve Owens 1982). Ancak bu çalışmalarda bitkilerin model organizma olarak kullanılması nedeniyle, çeşitli kimyasalların hayvanlar üzerindeki etkilerini tespit edebilmek için hayvansal hücrelerin kullanılması düşüncesi ön plana çıkmıştır. Bu nedenle, bitkilerle yapılan testler hayvanların değişik hücreleri kullanılarak yapılmaya başlanmıştır. Bu amaçla bu testlerden kromozom bozuklukları, mikronükleus oluşumu ve kardeş kromatidlerdeki parça değişimi testleri birçok araştırmacı tarafından yıllardır kullanılmaktadır (King ve Lunford 1950, Paton ve Allison 1972, Kroda vd 1992, Zhong vd 1992, Vaglenov ve Karadjov 1997, Vaglenov vd 1997 a, b, c). Ancak bu testlerin diğer birçok mutasyon testleri gibi *in vitro* koşullarda yapılıyor olması araştırmacıları bu testin, ökaryotik canlılarda *in vivo* koşullarda yapılan testlerle desteklenmesine yöneltmiştir. *In vitro* testlerde izole edilmiş olan hücreler ya doğrudan ya da belli bir

süre kültür ortamında çoğaltıldıktan sonra teste tabi tutulmaktadır. Bu izole edilmiş hücreler birbirlerinden bağımsız olarak üremektedirler. *In vitro* koşullardaki hücrelerin birbirleriyle olan iletişimleri *in vivo* koşullardaki gibi değildir. Bu konudaki problem, *in vitro* sistemlerin *in vivo*'daki karmaşık düzenleyici, sinerjetik ve antagonistik sistemlerin kendi aralarındaki düzenlerini yansıtmamalarıdır. Bu nedenle de *in vitro* çalışmaların sonuçları *in vivo* koşullarda yapılan çalışmaların sonuçlarından farklı olabilmektedir. Bu yüzden son yıllarda mutajenik etkilerin saptanabilmesi için *in vivo* koşullarda yapılan *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu test çeşitli genetik hasarları aynı anda saptayabilmesi açısından da önemli bir avantaj sağlamaktadır.

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *Drosophila melanogaster*'in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir. Bir canlıda bir kimyasalın genotoksik etkilerini belirlemede kullanılan testlerin bazıları için sirke veya meyve sineği olarak da bilinen *D. melanogaster* en sık başvurulan bir model organizmadır. *D. melanogaster*'in bu testler için kullanılması 1927'de Müller'in eşeye bağlı resesif letal mutasyon testini bulmasıyla başlamıştır (Müller 1927). *Drosophila*'nın mutajenite testlerinde tercih edilmesinin nedenleri; ökaryotik bir organizma olması, laboratuvar koşullarında küçük bir habitatta yaşayabilecek büyüklükte olması, jenerasyon süresinin 9–11 gün gibi kısa bir süre olması, çok sayıda yavru döl meydana getirebilmesi, kolay ve ucuz beslenebilmesi, biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemlerinin memelilerin enzim sistemleriyle büyük benzerlik göstermesi ve ökaryotik bir canlıda *in vivo* çalışma olanağı vermesi şeklinde sıralanabilir (Valencia vd 1984, 1989, Kaya 2000, Falakalı 1990). Sinek proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile dizilim benzerliği göstermektedir. *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin % 60'ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Böylelikle; insan hastalıklarında mutasyon, amplifikasyon veya delesyon ile değişime uğrayan 287 civarında gen *Drosophila* ortoloğudur. Kanseri, nörolojik hastalıklar, metabolizma bozuklukları, yapısal bozuklukları ve renal hastalıkları belirleyen genlerin büyük olasılıkla *Drosophila*'da kopyaları mevcuttur (Bernards ve Hariharan 2001).

Drosophila ve insan hücre döngülerinin ve düzenleyici yollarının benzerliği tümör genezis esnasında çoğalma süreci çalışmalarında bir model olarak hizmet eder. (Potter vd 2000). *Drosophila* imajinal disklerinin biyolojik özellikleri, kansere hassas birçok memeli hücresi ile benzerdir. İmajinal diskler ergin sineklerde birçok yapıyı oluşturan özelleşmiş epitel hücre keseleridir. Bu diskler tek hücre tabaka yapısındadır. Larval evrede çoğalarak karakteristik morfolojiye sahip olgun diskleri üretirler ve ergin bireylerde farklılaşırlar. Çoğalmaya ve farklılaşmaya giden özelleşmiş epitel hücreleri diploittir ve memeli hücrelerindeki hücre döngüsüne benzer hücre döngüsüne sahiptirler (G_1 , S, G_2 ve M safhalarını içerirler). Sinek ve memeli hücre döngüsündeki benzerlik sadece genel organizasyon seviyesi ile sınırlı değildir. Ayrıca moleküler seviyede de korunma vardır. Gelişimsel siklinler (A-, B- ve E- tip) ve onların siklin bağımlı kinaz partnerleri sinek ve insan arasında oldukça korunmuştur (Potter vd 2000). Bu amaçla *Drosophila* biyolojisi kanser araştırmalarında önemli bir model sağlar. Potter vd (2000), 1916'da *Drosophila* modern biyolojinin birçok konusundaki çalışmalarda en popüler model organizmalardan biri olmadan önce Bridges ve Stark'ın ilk defa sineklerin de tümör oluşturdıklarını ileri süren mutant larvalarda melatonik tümör benzeri granülleri keşfettiklerini bildirmektedirler.

Müller'in 1927'de eşeye bağlı resesif letal mutasyon testini bulmasıyla genotoksikolojik çalışmalarda *D. melanogaster* kullanılmaya başlanmıştır (Müller 1927). Bu test çevresel kimyasalların taranmasında oldukça hassastır. Aynı zamanda erkek eşey hücrelerinde nokta mutasyon ve küçük delesyonların taranmasına da hizmet etmektedir (Kumari ve Krishnamurthy 1986). *Drosophila* çalışmaları kimyasalın mutajenik yanıtı ve kanserojenik aktivitesi arasında iyi bir ilişki kurar (Batiste-Alentorn vd 1995). *Drosophila* somatik dokularında genetik değişimlerin belirlenmesi için çeşitli kısa dönem mutasyon çalışmaları geliştirilmiştir. Özellikle meyve sineğinin farklı imajinal disk hücreleri kullanılarak çeşitli testler yapılmaktadır.

D. melanogaster'in imajinal disklerinden faydalanılarak yapılan bir diğer çalışma da kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testidir (SMART). 1984 yılında Graf ve arkadaşları tarafından geliştirilen *D. melanogaster* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi sayesinde elektronegatiflik ile genotoksosite arasındaki ilişkinin

araştırılması (Rozenkranz ve Klopman 1996), herbisitlerin (Kaya vd 2000), fungusitlerin (Osaba vd 2002, Rahden-Staron 2002), çevre kirleticilerin (Amaral vd 2005, 2006), kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar (Lehmann vd 2003), antiviral, anti-kanser ve anti-depresant ilaçlarının (Frei vd 1992, Marec ve Gelbic 1994, van Schaik ve Graf 1991, Kocaoğlu 2004), alkileyici ajanların (Goto vd 1999, Olvera vd 2000), uçucu yağların (Idaomar vd 2002, Munerato vd 2005), anti-parazitik nitrofuranların (Alonso-Moraga ve Graf 1989), ökaryotik topoizomera inhibitörlerinin (Frei ve Würgler 1996) ve bazı insektisitlerin (Osaba vd 1999, Batiste-Alentorn vd 1995) mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması gibi yapılan bazı çalışmalar yoğun olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda, oluşturulan özel hatlar sayesinde tamir bozukluklarının saptanması (Graf vd 1990) ve kimyasalların parçalanma ürünlerinin mutajenik ve rekombinojenik etkileri (Guzman-Rincon ve Graf 1995) gibi yeni çalışmalar da yapılmıştır. Çeşitli grup kimyasal bileşiklerin yapı-aktivite ilişkisinin çalışılması için de kullanışlı bir testtir (Graf 1995). *Drosophila*, biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemleri memelilerinkine benzeyen bir organizma olduğu için çeşitli kimyasalların yanı sıra bu kimyasalların parçalanma ürünlerinin mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılmasında (Guzman-Rincon ve Graf 1995) da elverişlidir. Kullanılan özel genetik hatlar sayesinde kimyasalın sadece mutajenik etkisi değil aynı zamanda rekombinojenik etkisi hakkında da bilgi sahibi olunabilmektedir (Kaya vd 2006). Ayrıca yine Graf ve Schaik (1992) tarafından geliştirilen yüksek metabolik aktiviteye sahip hatların bu testte kullanılmasıyla genotoksik bir maddenin genotoksitesinin doğrudan kimyasalın kendisiyle mi yoksa biyoaktivasyon sonucu oluşan parçalanma ürünleriyle mi olduğu bulunabilmektedir (Kaya 2000).

Benzil türevleri ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* genotoksikite çalışmaları hakkındaki verileri çelişkilidir. Örneğin, Benzil alkol, L5178Y fare lenfoma hücreleri kullanılarak yapılan mutasyon testinde mutasyon oluşumunu indüklerken, *E. coli* WP2 uvrA kullanılarak yapılan bir başka mutasyon testinde ise negatif sonuçlar vermiştir. (NTP 1989, Kuroda vd 1984b). Benzaldehit, Çin kobay yumurtalık hücreleri kullanılarak yapılan kardeş kromatid değişikliği testinde pozitif sonuçlar verirken (Galloway vd 1987), Sasaki ve arkadaşlarının (1989) aynı test ile yaptıkları bir başka çalışmada ise Benzaldehit'in kullanılan derişime bağlı olarak negatif sonuçlar verdiği

tespit edilmiştir. Oda ve arkadaşlarının (1979) yaptıkları bir çalışmada, Benzil asetat *B. subtilis* H17 ve M45 hatları kullanılarak yapılan rekombinasyon testinde negatif sonuç verirken, aynı testi kullanarak yapılan başka bir çalışmada ise Benzil asetat rekombinasyonu uyarmıştır (Yoo 1986).

Son yıllarda gerek bütün dünyada gerekse ülkemizde gıda katkı maddelerinin çok yoğun olarak üretilmesi ve kullanılması bu kimyasalların genotoksikolojik etkilerinin daha ayrıntılı olarak bilinmesi gereğini doğurmuştur. Benzil türevlerinin genotoksik işlevleri ile ilgili fazla veri bulunmamakta ve bu konudaki eldeki verilerde çelişkilidir. Bu nedenle bu çalışmada yiyecek ve içeceklerde yaygın olarak kullanılan benzil türevlerinden; Benzaldehit, Benzil asetat, Benzil alkol ve Benzoik asit'in, *D. melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada, 4 farklı benzil türevinin *D. melanogaster* hatlarında genotoksikolojik etkilerini saptamak üzere kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanıldı.

Bu test transheterozigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimlerin fenotipte gözlenmesi esasına dayanır (Graf vd 1984, 1989). Genetik değişimlerin fenotipte gözlenebilmesi için *Drosophila melanogaster*'de *mwh* (multiple wing hair) ve *flr*³ (flare) genleri belirleyici (marker) gen olarak kullanılmıştır.

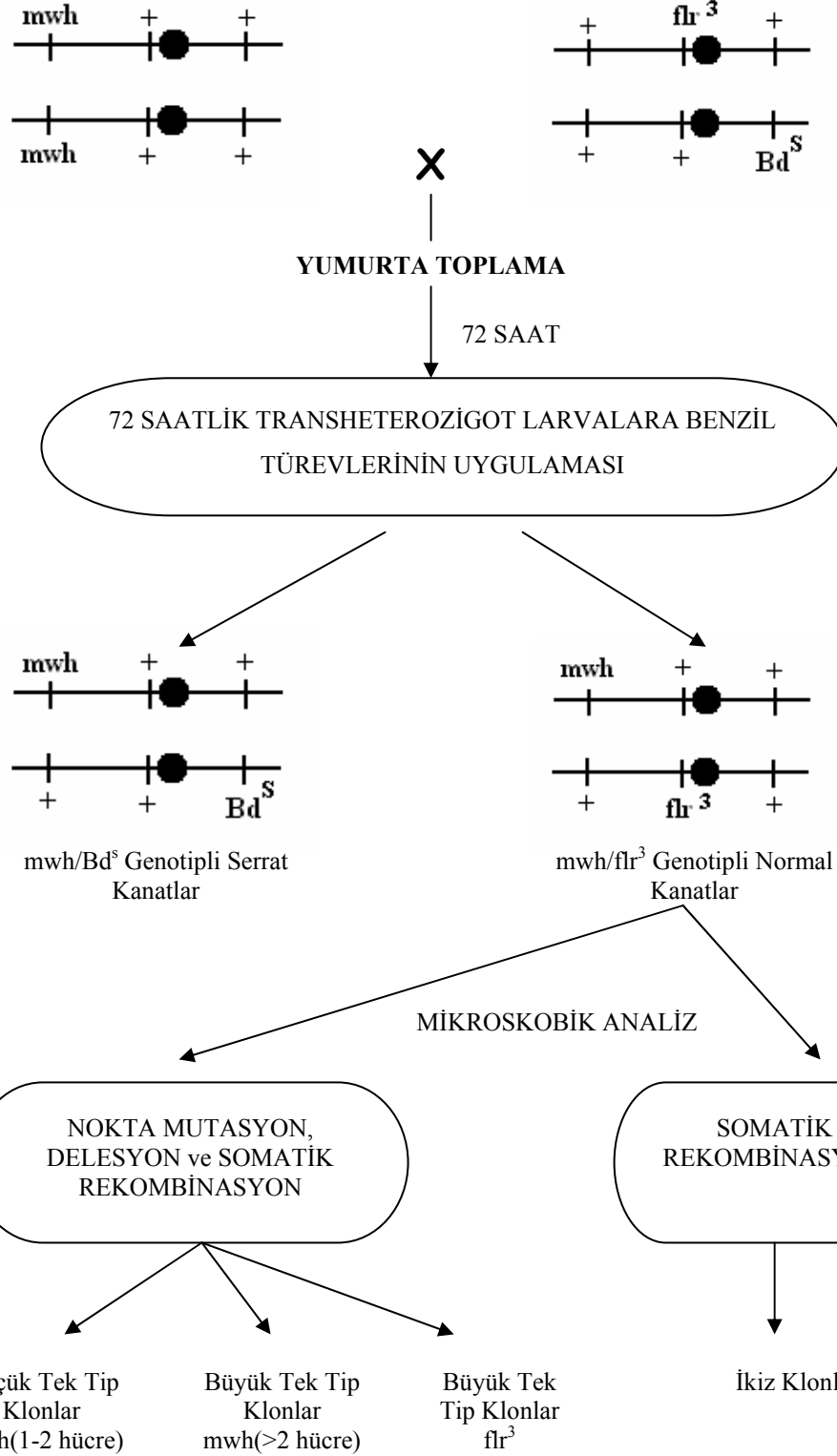
D. melanogaster kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin basamakları şematik olarak şekil 2.1'de gösterilmektedir. *D. melanogaster*'in üçüncü kromozomu üzerinde bulunan belirleyici genlerdeki değişimler; hazırlanan kanat preparatlarının ışık mikroskobu yardımıyla 10X40 büyütmede incelenmesi ile mutant klonlar olarak saptanabilmektedir.

2.1 *Drosophila melanogaster*'in Yaşam Döngüsü

Diptera ordosundan tam başkalaşım gösteren (holometabol) bir böcek olan *Drosophila*, diploid kromozom sayısına sahiptir ve dört çift kromozom taşımaktadır (Rothwell 1993).

Laboratuvar çalışmalarında kullanılan *Drosophila melanogaster* genetik araştırmalar için iyi bir model organizmadır. *Drosophila*, ökaryotik bir sistem olması, çalışmaların *in vivo* ortamlarda gerçekleştirilmesi, kısa hayat döngüsü ve yüksek üreme oranından dolayı tercih edilen bir model organizma haline gelmiştir. *D. melanogaster*'in genetik çalışmalar için model organizma olarak kullanılması ilk defa 1909 yılında Morgan tarafından önerilmiştir (Falakalı 1990).

DROSOPHILA KANAT SOMATİK MUTASYON ve REKOMBİNASYON TESTİ



Şekil 2.1. *Drosophila melanogaster*' de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi

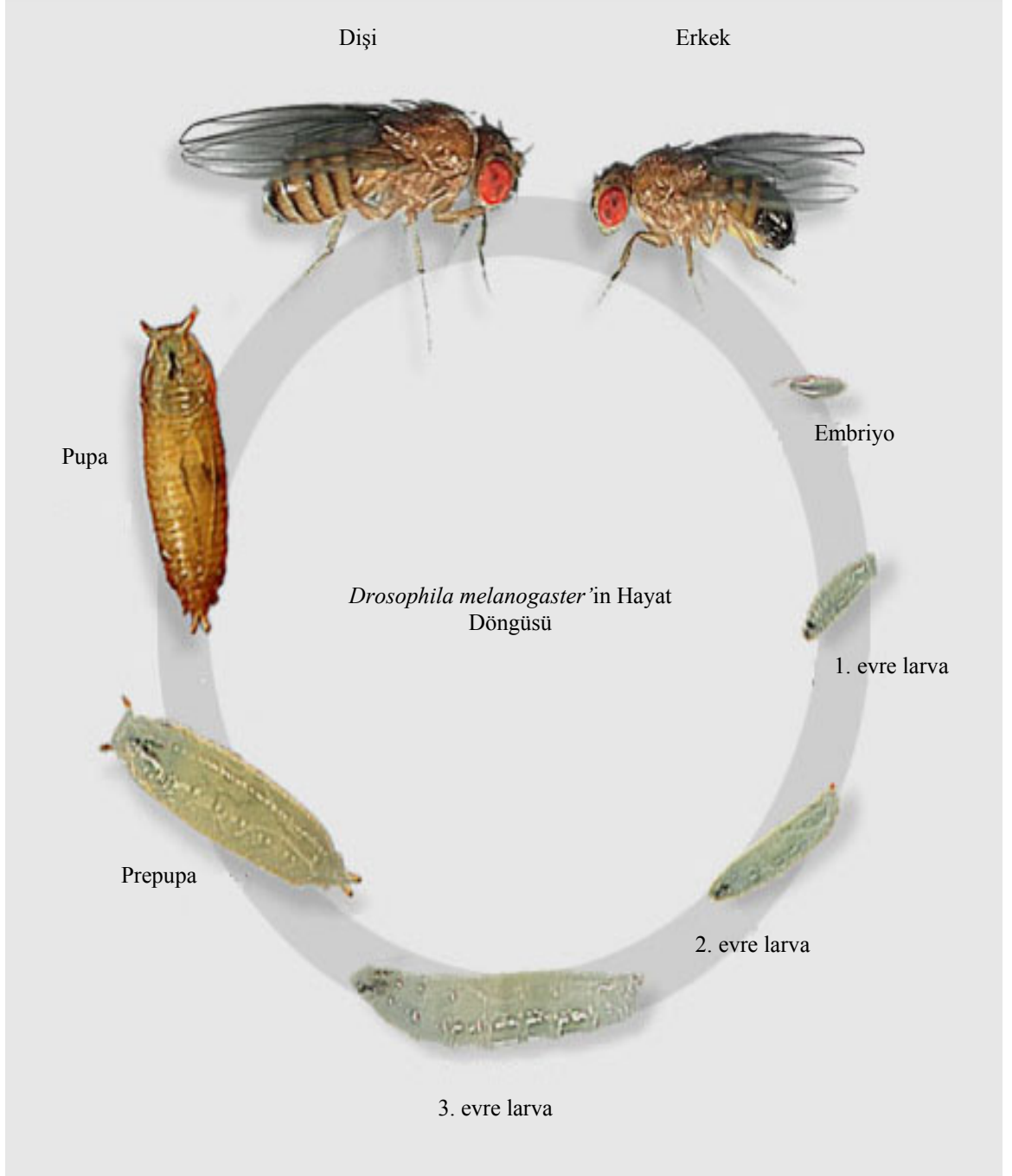
İdeal yaşam koşulları olan 25 °C ve % 60 bağıl nem ortamında olgunlaşma süreci 9–11 gün olan *Drosophila*'nın yaşam döngüsü şekil 2.2'de şematik olarak gösterilmiştir.

Drosophila'nın gösterdiği başkalaşım evreleri ve bu evrelerin süreleri 25 °C de aşağıdaki gibidir.

Embriyonik gelişim:	1 gün
Birinci larval evre (L1):	1 gün
İkinci larval evre (L2):	1 gün
Üçüncü larval evre (L3):	2 gün
Prepupa evresi:	4 saat
Pupa evresi:	4.5 gün
Yetişkin evresi:	40–50 gün

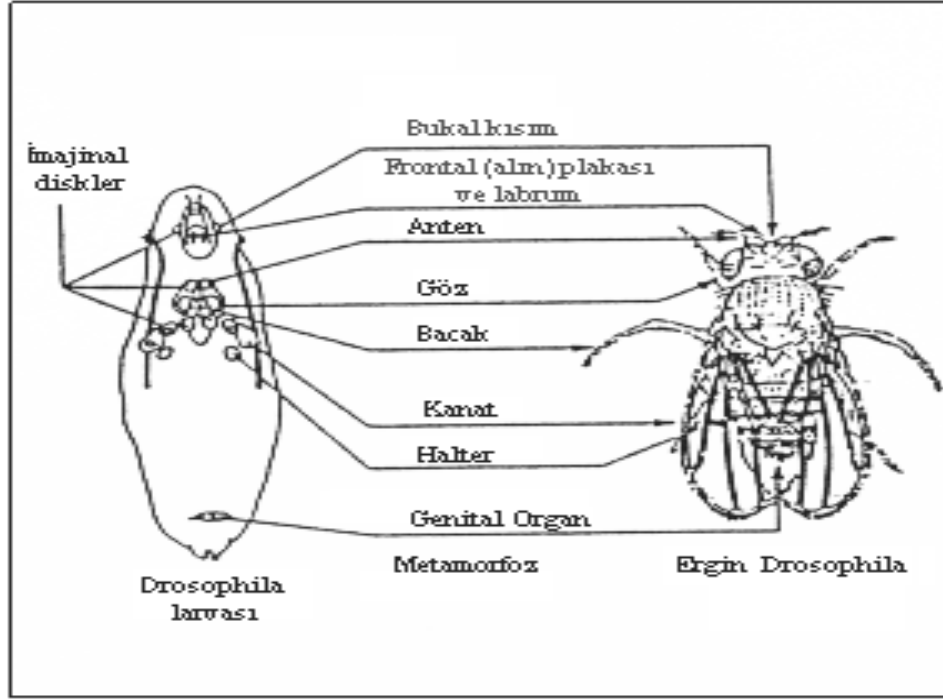
Pupadan ilk çıktıklarında vücut uzun ve açık renkte, kanatlar kısa ve kıvrık görünümlü bir durumdadır, ilerleyen bir kaç saat içinde yeni çıkan bireyler normal görünümlü ergin bireyler halini almaktadır. Ergin bireylerin ortalama yaşam süreleri 40–50 gün arasında olmasına karşın 80–90 gün yaşayan bireyler de gözlenmiştir (Graf vd 1992).

Drosophila'nın erkek bireyleri pupadan çıktıklarında eşeyssel olgunluğa erişmiş durumdadır. Ancak dişi bireylerin eşeyssel olgunluğa erişmesi için 6–12 saat gibi bir zamanın geçmesi gerekmektedir. Bu dönemdeki dişi bireyler henüz döllenme yeteneğinde değildirler. Bu yüzden virjin olarak adlandırılırlar ve çalışmalarda bu virjin dişiler kullanılmaktadır.



Şekil 2.2. *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsü

Genellikle 2.1–2.2 mg ağırlığında olan üçüncü larva evresinde olan bireyler yaşama ortamlarında kuru bir yer bularak pupa evresine geçerler (Ashburner 1989, Würgler ve Vogel 1986). Pupa içerisinde imajinal disk hücrelerinin bölünerek çoğalmasından sonra metamorfoz geçirerek oluşan ergin bireyler pupa kılıfını üst kısmından yırtarak çıkmaktadırlar. İmajinal disk hücrelerinin larvadaki pozisyonları ve sayıları Şekil 2.3’de görülmektedir.



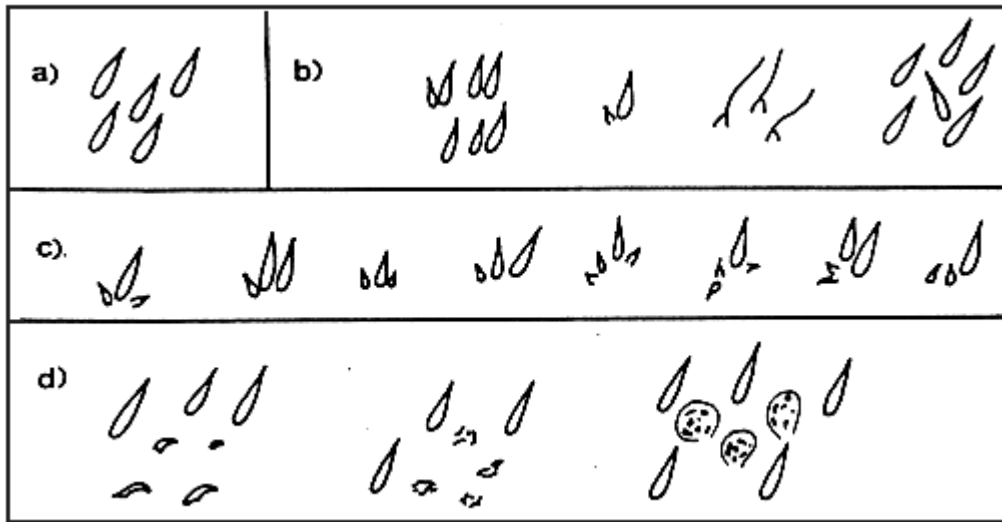
Şekil 2.3: İmajinal disk hücrelerinin larvadaki konumları (Markert ve Ursprung 1977)

2.2 Kullanılan Hatların Genetik Yapısı

Kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan hatlar, üçüncü kromozomları üzerinde iki belirleyici gen taşımaktadırlar. Çalışmada kullanılan bireylerin genetik yapısı aşağıdaki gibidir (Lindsley ve Zimm 1992, Garcia-Bellido ve Dapena 1974, Lindsley ve Grell 1968).

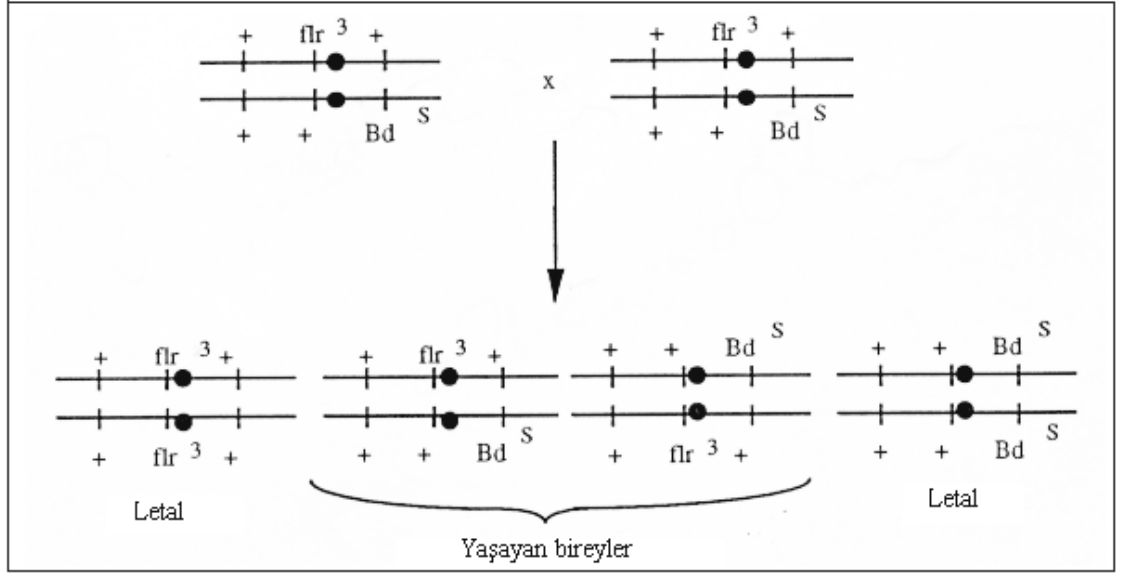
- mwh / mwh
- flr3 / ln (3LR) TM3, ri p^p sep bx^{34e} e^s Bd^s
- kısaca;
- flr3 / TM3, Bd^s olarak gösterilmektedir.

Normal kanatlarda kıllar düz ve uzun bir yapı gösterirken flare (flr 3–38.8) geninde kanat kılları kısa, kalın ve şekilsizdir (Şekil 2.4). Mwh (multiple wing hair, 3–0.3) geni ise aynı hücreden tek bir kıl yerine üç veya daha fazla sayıda kanat kılının çıkmasıyla kendini göstermektedir (Şekil 2.4) (Kaya 2000).



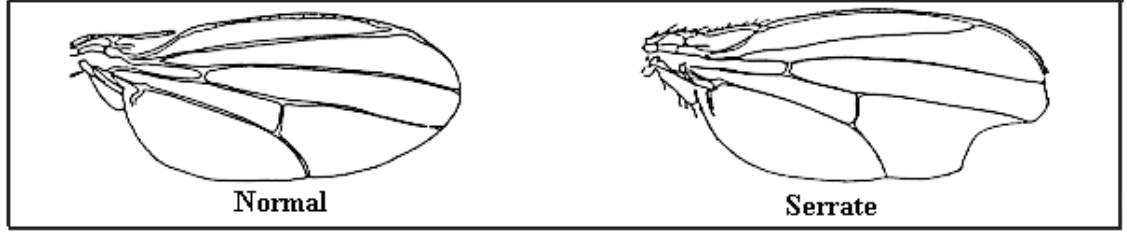
Şekil 2.4. Kanat trikomlarının görünümü a) normal b) farklılaşmış fakat ne flare ne de mwh olarak sınıflandırılmayacak trikomlar c) mwh trikomlar d) flare genotipe ait trikomlar

Flare geni homozigot halde iken embriyonik evrede letal etki göstermektedir (Şekil 2.5). Bireyleri, bu letal etkiden korumak için TM3 dengeleyici kromozomu kullanılmaktadır. Dengeleyici kromozom, letal etkisinden korunmak istenen genin bulunduğu homolog kromozomlardan birinde bulunur. Ayrıca dengeleyici kromozom rekombinasyonu baskılayarak mutasyon ve rekombinasyonun birbirinden ayrılmasını da sağlamaktadır.



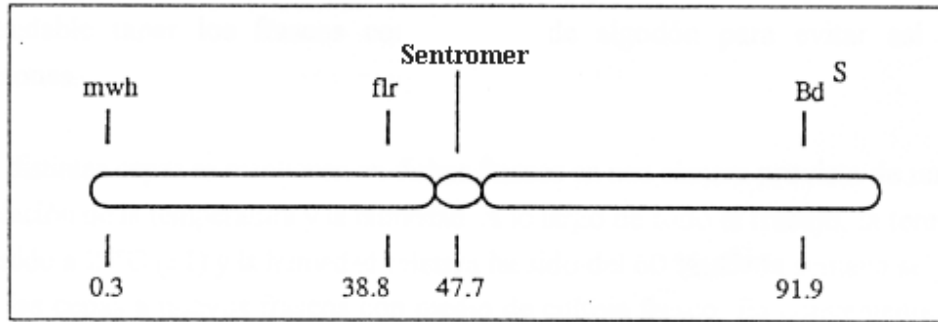
Şekil 2.5. $Flr^3 / TM3, Bd^S$ bireylerindeki homozigot letal etkiler

Normal fenotipteki kanatların kenarları düzgün bir yapı gösterirken, Bd^S (Beaded Serrat) genini taşıyan bireylerde kanat kenarları düzgün değildir (Şekil 2.6). Homozigot halde letal etki gösteren dominant Bd^S geni, TM3 dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır ve böylelikle TM3 dengeleyici kromozomuna sahip bireyler kanat fenotiplerinin incelenmesiyle diğer bireylerden kolaylıkla ayrılabilir.



Şekil 2.6. Dengeleyici kromozom taşımayan normal ve dengeleyici kromozom taşıyan Bd^S bireylerinin kanat fenotipleri

Üçüncü kromozomun en büyük kromozom olması ve belirleyici genler arasındaki mesafenin de oldukça uzak olması gerek rekombinasyonun ve gerekse mutasyonların büyük bir aralıkta incelenmesi açısından bir avantaj oluşturmaktadır. Bu çalışmada kullanılan genetik hatların taşıdığı TM3 dengeleyici kromozomu çalışmada belirleyici olarak kullanılan *flr*, *mwh* ve Bd^S genleri ile birlikte *Drosophila*'nın üçüncü kromozom üzerinde bulunmaktadır (Şekil 2.7) ve bu kromozom üzerindeki rekombinasyonların baskılanması açısından önemlidir.



Şekil 2.7. *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki yerleşimleri

2.3. *Drosophila* Hatlarının Kùltürü

Drosophila melanogaster’ler, ideal yaşam koşullarına (25 °C ve % 60 bağıl nemde) sahip özel iklim odasında standart Lewis besin ortamında (Lewis ve Bacher 1968) kùltüre alınmaktadır. Ayrıca iklim odasının aydınlatması 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmıştır. Standart Lewis besin içeriğı aşağıdaki gibidir;

✓ Mısır unu	104 g
✓ Şeker	94 g
✓ Maya	19 g
✓ Agar	5–6 g
✓ Asit karışımı	6 ml
✓ Distile su	1020 ml

Besin ortamındaki asit karışımında Propionik asit (Merck), Ortofosforik asit (Carlo Erba) ve distile su bulunmaktadır. Bu asit karışımı besinin kontamine olmasını engellemek amacıyla kullanılmaktadır. Aksi halde besin, yumurta verimini ve bireylerin gelişimini olumsuz yönde etkileyen fungus ile kontamine olmaktadır.

Asit hariç diğér maddelerin karıştırılmasıyla oluşan solusyonun ateş üzerinde karıştırılarak kaynaması sağlandı. Karışım kaynamaya başladıktan sonra kısık ateş üzerinde 1–2 dakika daha kaynatıldı ve ateşten indirilerek asit karışımı eklenerek asitin eşit olarak dağılması için iyice karıştırıldı. Hazırlanan bu standart *Drosophila* besini şişelere yaklaşık olarak 1–1.5 cm kalınlığında döküldü ve şişelerin ağızları kurutma kağıtlarıyla kapatılarak kurumaya bırakıldı. Hazırlanmış olan besinler yeterince kuruduktan sonra (yaklaşık 1–2 gün) yeterli sayıda döllememiş dişi toplayabilmek için kùltür zenginleştirildi. Kùltür iklimlendirilmiş kùltür ortamında 25 ± 0.5 ° C de % 60 bağıl nem ortamında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olan ortamda yetiştirildi.

Kùltüre alınan bireyler kuru olan besin üzerine yumurta bırakırlar. Bir gün sonra yumurtalar açılır ve larvalar besin içerisinde beslenmeye başlarlar. Yumurtadan çıkıp pupa oluşturuncaya kadar larvalarda gözle görülür bir büyüme gözlenirse de, imajinal disk hücreleri hariç diğér larvalar hücrelerinde bölünme gözlenmez. Hücreler sadece boyut

olarak büyüme yoluna gitmektedirler. Larvalar üçüncü evreye ulaştıklarında yaşama ortamlarında kuru bir yer bularak pupa evresine geçerler (Ashburner 1989, Würbler ve Vogel 1986). Pupa içerisinde imajinal disk hücrelerinin bölünerek çoğalmasından sonra metamorfoz geçiren bireyler ergin bireyler hale gelerek pupadan dışarı çıkmaktadırlar.

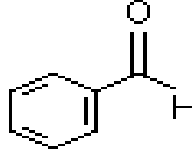
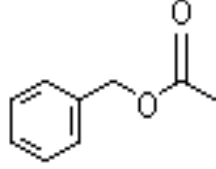
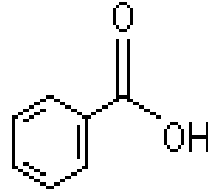
2.4. Deney Grupları

Bu çalışmada, yiyecek ve içeceklere lezzet vermek amacıyla gıda katkı maddesi olarak sıklıkla kullanılan Benzil türevlerinin seçilmesine dikkat edilmiştir. Benzil türevlerinden Benzaldehit, Benzil asetat, Benzil alkol ve Benzoik asit olmak üzere toplam 4 kimyasalın mutajenik ve rekombinojenik etkileri çalışılmıştır.

Yapılan çalışmada kimyasalların çözündüğü ve genotoksik etkisi olmayan distile su negatif kontrol grubu olarak seçilmiştir. Ayrıca test sistemimizin çalıştığından emin olmak için mutajenik etkisinin olduğunu bildiğimiz EMS de pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan bütün Benzil türevlerinin isimleri, kimyasal yapıları ve dâhil oldukları gruplar Çizelge 2.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan Benzil türevleri

Kimyasal adı (Grubu), CAS no. Saflık Derecesi	Kimyasal Yapısı
BENZALDEHİT Benzenecarboxaldehyde; Benzoic aldehyde 100-52-7 % 99	
BENZİL ASETAT Acetic acid benzyl ester 140-11-4 % 99.7	
BENZİL ALKOL Benzenemethanol 100-51-6 % 99	
BENZOİK ASİT Benzenemethanoic Acid; Carboxybenzene 65-85-0 % 99.5	

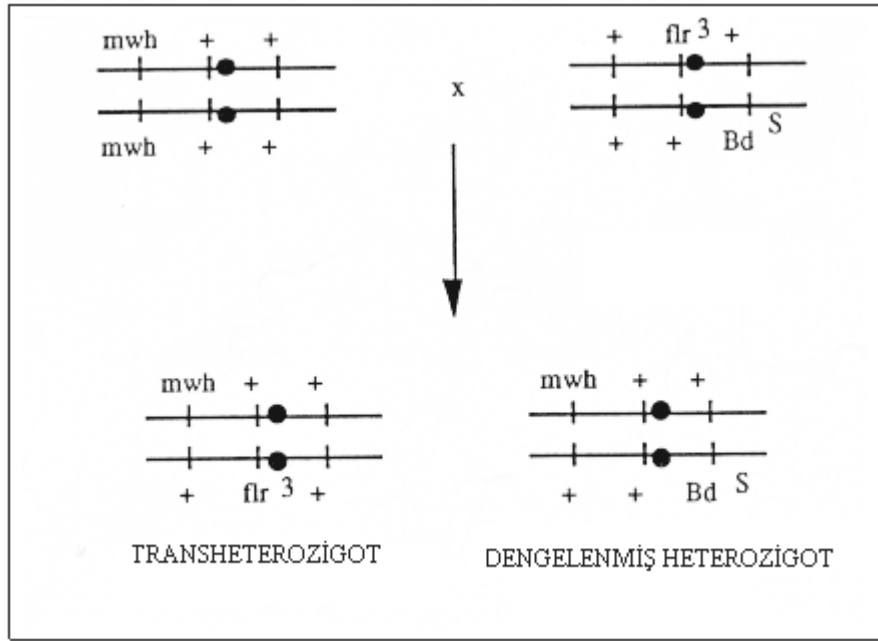
2.5. Transheterozigot Larvaların Elde Edilmesi

Bu çalışmada; mwh / mwh ve flr³ / TM3, Bd^S genetik yapılı bireylerin çaprazlanması ile elde edilen transheterozigot larvalar kullanıldı. Yapılan çaprazlama aşağıdaki gibidir.

$$\text{♀ flr}^3 / \text{TM3, Bd}^S \times \text{♂ mwh / mwh}$$

flr³ / TM3, Bd^S hattının yüksek yumurta verimine sahip olması nedeniyle çaprazlamada dişi bireyleri tercih edilmiştir.

Transheterozigot larvaların elde edilebilmesi için döllenmemiş dişi bireylerin kullanılması gerekmektedir. Bunun için de 4'er saat aralıklarla pupadan çıkan dişi bireyler toplanarak yeni bir besin ortamına alındılar. Bireylerin yaşı üreme verimi üzerinde etkili olduğundan, üreme verimliliği için en ideal yaş olan 3–7 günlük bireyler tercih edildi. Ayrıca yeterli miktarda transheterozigot larvanın elde edilebilmesi için her şişeye ortalama 40 ♂ ve 40 ♀ olacak şekilde birey konularak çaprazlama yapıldı ve bu bireyler en az bir gün aynı ortamda bırakılarak döllenme ve embriyogenezin gerçekleşmesi sağlandı. Daha sonra bireyler yeni bir besin ortamına alınarak 8 saat boyunca yumurta bırakmaları sağlandı. Böylece aynı larval evrede olan transheterozigot larvalar elde edilmiş oldu. Aynı bireyler yumurta toplama işlemi için defalarca kullanıldı. Larvaların elde edilebilmesi için yapılan çaprazlama şekil 2.8.'de gösterilmektedir (Graf vd 1984, 1989, Schaik ve Graf 1991).



Şekil 2.8. Dengelenmiş heterozigot mwh/Bd^S ve transheterozigot mwh/flr^3 bireylerin elde edilebilmesi için mwh/mwh ve $flr^3/TM3$, Bd^S bireyleri arasındaki çaprazlamalar

2.6. Benzil Türevlerinin Uygulanması

Çalışmada, genotoksik etkilerinin test edilmesi için 4 Benzil türevinin 6 farklı derişimi (0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM) kullanıldı.

İmajinal diskler, larval gelişim periyodu boyunca sürekli mitotik bölünme ile büyüyen hücrelerdir. Kanat imajinal disk hücreleri, birinci larval evrede yaklaşık 50–100 kadardır. Üçüncü larval evrede (72 saatlik larva) bu sayı yaklaşık 24.400'e ulaşmaktadır (Graf 1995). Genç larvalarda oluşan klonlar sayı bakımından azdır fakat bunlar oldukça büyük klonlardır. Larval gelişim esnasındaki sürekli hücre çoğalması, imajinal disklerdeki hedef hücre sayısının artmasına neden olur. Böylece mutajen uygulanan larvanın yaşının artması ile birlikte klon indüksiyon frekansının artması beklenir. Artan klon sayısının aksine oluşan klonların büyüklükleri genç larvalara göre daha küçüktür (Graf 1995). Bu yüzden Graf (1995), kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için mutajen uygulanmasında en uygun zamanın 72. saat olduğunu bildirmektedir.

Sekiz saat boyunca toplanan dölllenmiş yumurtalardan çıkan larvalar üçüncü larval evreye ulaştığında (72 saat sonra), besinler musluk suyu altında yıkanarak larvalar ince gözenekli metal elekten geçirilerek ayrıldı. 72 ± 4 saatlik larvaların uygulama ortamı olarak kullanılan plastik tüpler içerisine birer ölçü (~ 4.5 gr) hazır *Drosophila* besini (*Drosophila* Instant Medium) (Formula 4-24, Carolina Biological Supply Co., Burlington, NC, ABD) konuldu ve besinler uygulamadan hemen önce hazırlanmış kimyasal derişimlerinin 9 ml'si ile nemlendirildi. Her bir tüp içerisine musluk suyu altında ayrılan larvalardan 1–2 spatül dolusu (yaklaşık 100 larva) konuldu ve tüplerin ağzları sünger tıkaçlarla kapatıldı. Kimyasal uygulanan tüpler 25 ± 0.5 °C'deki inkübatöre (Sanyo) konuldu. Böylece larvaların, 48 saat süresince ortama konulan benzil türevleri ile nemlendirilmiş hazır besinle beslenerek kronik olarak kimyasala maruz kalmaları sağlandı.

Çalışılan her bir derişim için hem normal ve hem de serrat kanatlı bireylerden tesadüfî olarak 40 birey (80 kanat) seçilerek kanat preparatları hazırlandı. Her bir derişim için 80 kanadın istatistikî değerlendirmeler için yeterli olduğu Frei ve Würzler (1995) tarafından belirlenmiştir.

2.7. Ergin Bireylerin Toplanması ve Kanat Preparatlarının Hazırlanması

Benzil türevlerinin uygulamasından sonra farklılaşarak pupadan çıkan ergin bireyler eterle bayıltılarak toplandı. Yeterli sayıda birey elde edilinceye kadar her gün bu işleme devam edildi. Toplanan bireyler, kanat preparatları hazırlanıncaya kadar % 70'lik etil alkole alınarak +4° C'de saklandı.

Uygulamadan elde edilen bireyler kanat morfolojilerine göre normal kanatlı (transheterozigot *mwh/flr*³) ve serrat kanatlı (dengelenmiş heterozigot *mwh/TM3*, *Bd*^S) olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Alkol içerisinde +4 derecede saklanan bireyler saat camına alınarak ilk önce kanat morfolojilerine göre ayrıldılar. Bu kanatlardan normal fenotipe sahip (*mwh/flr*³) kanatlar hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonları içermesine karşın serrat (*mwh/TM3*, *Bd*^S) kanatlar dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması nedeniyle sadece mutasyon sonucu oluşan

klonları içermektedir (Zordan vd 1994, Kaya vd 1999). Bu nedenle her iki fenotipteki kanatların da preparatları ayrı ayrı hazırlanarak değerlendirildi.

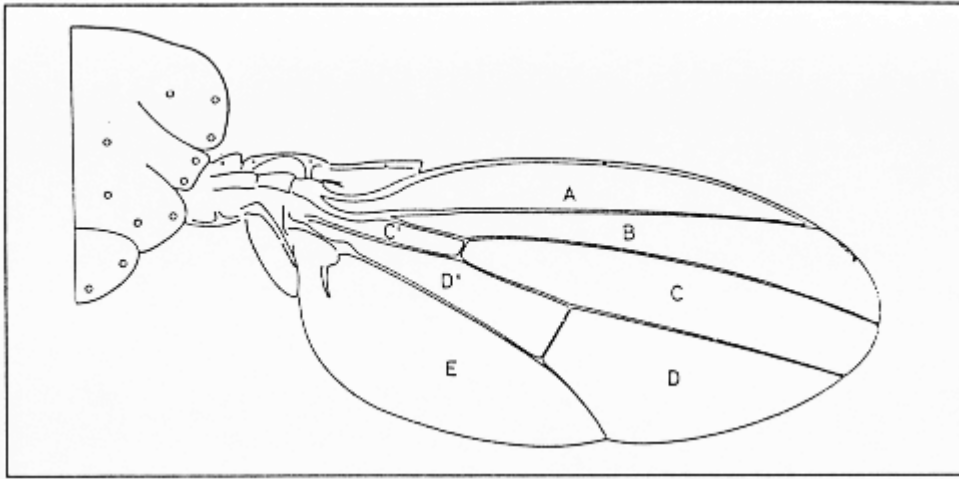
Kanat preparatlarını hazırlanmasında kullanılan Faure solusyonu'nun içeriği aşağıdaki gibidir (Kaya 2000).

- | | |
|-----------------|-------|
| ➤ Gum Arabic | 30 g |
| ➤ Gliserol | 20 ml |
| ➤ Kloral hidrat | 50 g |
| ➤ Distile Su | 50 ml |

Kanat morfolojilerine göre normal ve serrat kanatlı olarak ayrılan bireyler distile su içerisine alındılar. Çukur lam üzerine 1–2 damla faure solusyonu damlatılarak distile su içerisindeki bireyler birer birer solüsyon içerisine alındılar. Daha sonra ince uçlu pens ve iğne yardımıyla stereo mikroskop altında bireylerin kanatları vücutlarından ayrıldı. Ayırma işleminde, kanada ve üzerindeki kıllara zarar verilmemesine dikkat edildi. Aynı bireye ait kanatlar çiftler halinde düzgün bir şekilde lam üzerine yerleştirildi. Hazırlanan preparatlar bir gün süre ile tozsuz bir ortamda kuruması için bekletildi. Kuruyan preparatların üzerine 1–2 damla faure solüsyonu damlatılarak lamel (24X60 mm) ile hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Preparatlar kurutma kâğıdına sarıldıktan sonra üzerlerine metal bloklar konarak en az iki gün kurumaya bırakıldılar. Preparatlar tamamen kuruduktan sonra kenarlarına taşmış olan fazla faure solüsyonu distile su ve kurutma kâğıdı yardımıyla temizlenerek sayıma hazır hale getirildi.

2.8. Kanat Preparatlarının Mikroskobtaki Analizi

Hazırlanan kanat preparatları ışık mikroskobunda 10X40 büyütmede incelendi. Kanat üzerindeki sektörler incelemede kolaylık sağlaması açısından A, B, C, C¹, D, D¹ olarak bölümlere ayrıldı (Şekil 2.9). Her bir sektörün her iki yüzündeki (dorsal ve ventral) hücre tabakaları da mikrovida yardımıyla kontrol edilerek mutant klonların olup olmadığı incelendi ve bunların kayıtları tutuldu (Kaya 2000).

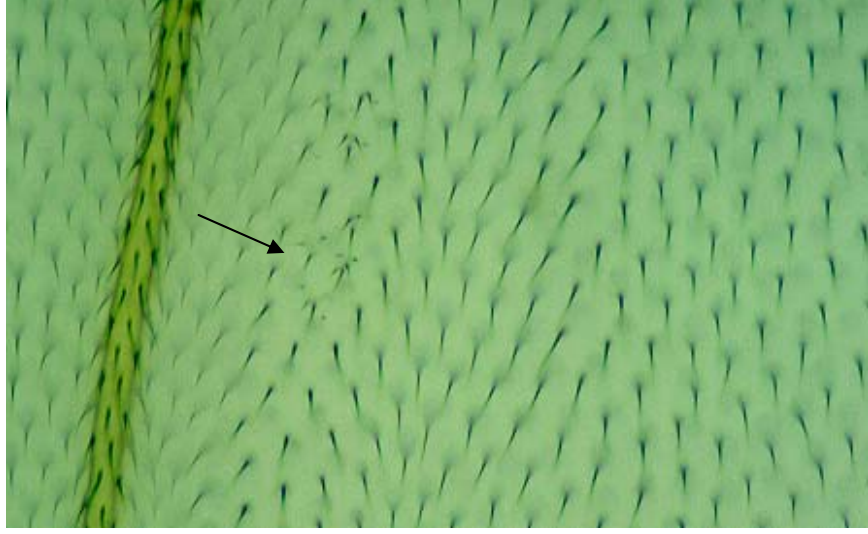


Şekil 2.9. Kanat sektörlerinin şematik görünümü

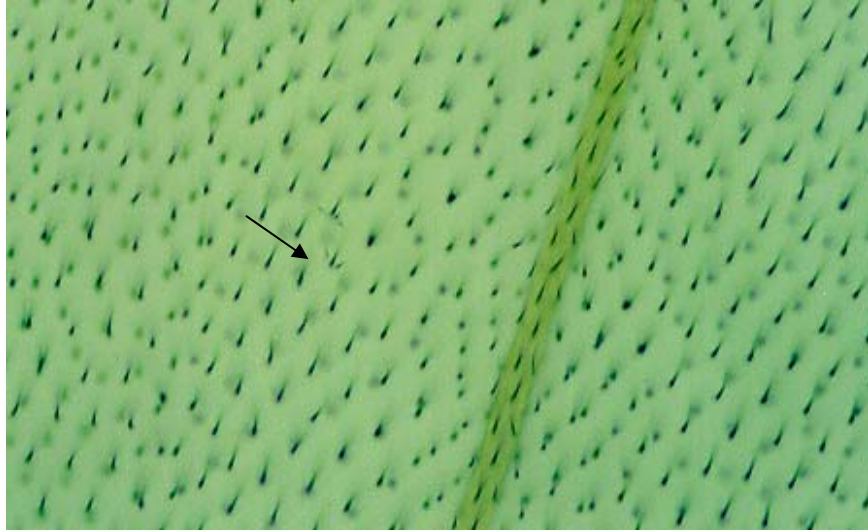
Sayımda mutant klonlar, küçük tek tip klon, büyük tek tip klon ve ikiz klon olmak üzere üç kategoride değerlendirildi. Bu sınıflandırmanın biyolojik açıdan anlamlı olduğu Graf ve ark. (1984) tarafından gösterilmiştir. Sınıflandırmada küçük tek tip klonlar sadece 1 veya 2 tane mwh hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 2.11).

Büyük tek tip klonlar 3 veya daha fazla mwh ya da 4 veya daha fazla flare mutant hücrelerinin oluşturduğu klonlardır (Şekil 2.10 ve Şekil 2.13). Daha önce yapılan çalışmalarda flare klonlar için dörtten daha az sayıda gözlenen sadece flare fenotipteki trikomların oluşturduğu klonların varyasyon nedeniyle olduğu, bu yüzden flare fenotipteki klonlar için dörtten daha fazla sayıdaki hücrelerin sayıma dahil edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Szabad vd 1983). Bu nedenle küçük tek tip klonlar sadece mwh hücrelerden oluşmaktadır. Diğer bir kategori olan ikiz klonlar ise mwh ve flr hücrelerinin aynı klon içerisinde dağılmış olarak bulunduğu klonlardır (Şekil 2.12).

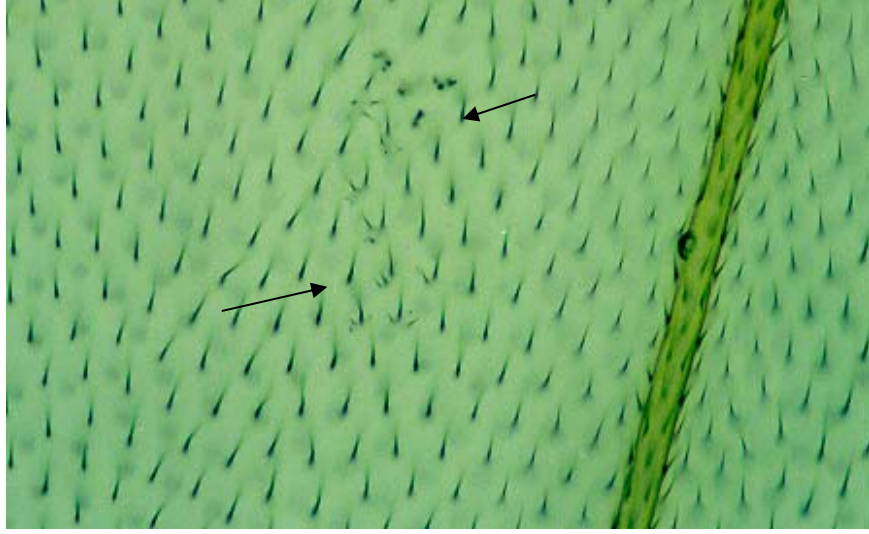
mwh ve flr hücreleri aynı klon içerisinde bulunabildikleri gibi yan yana iki ayrı klon olarak da bulunabilirler. Graf ve ark. (1984) birbirine komşu iki mutant klonun sınıflandırılmasında, iki klon arasında üç yada daha fazla sayıda yaban tip trikoma sahip hücre sırası varsa bunları iki farklı klon olarak değerlendirmişlerdir. Mwh klonların oluşması nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve rekombinasyon sonucu olmaktadır (Şekil 2.14). Buna karşın, gerek flare klonlar gerekse ikiz klonlar flare geni ile sentromer arasında gerçekleşen bir rekombinasyon sonucu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.14).



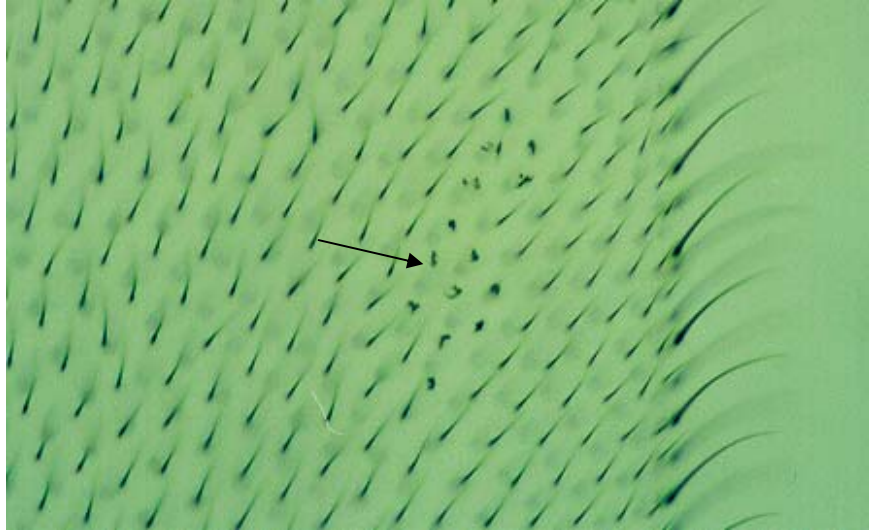
Şekil 2.10. Büyük tek tip mwh mutant klonların görünümü



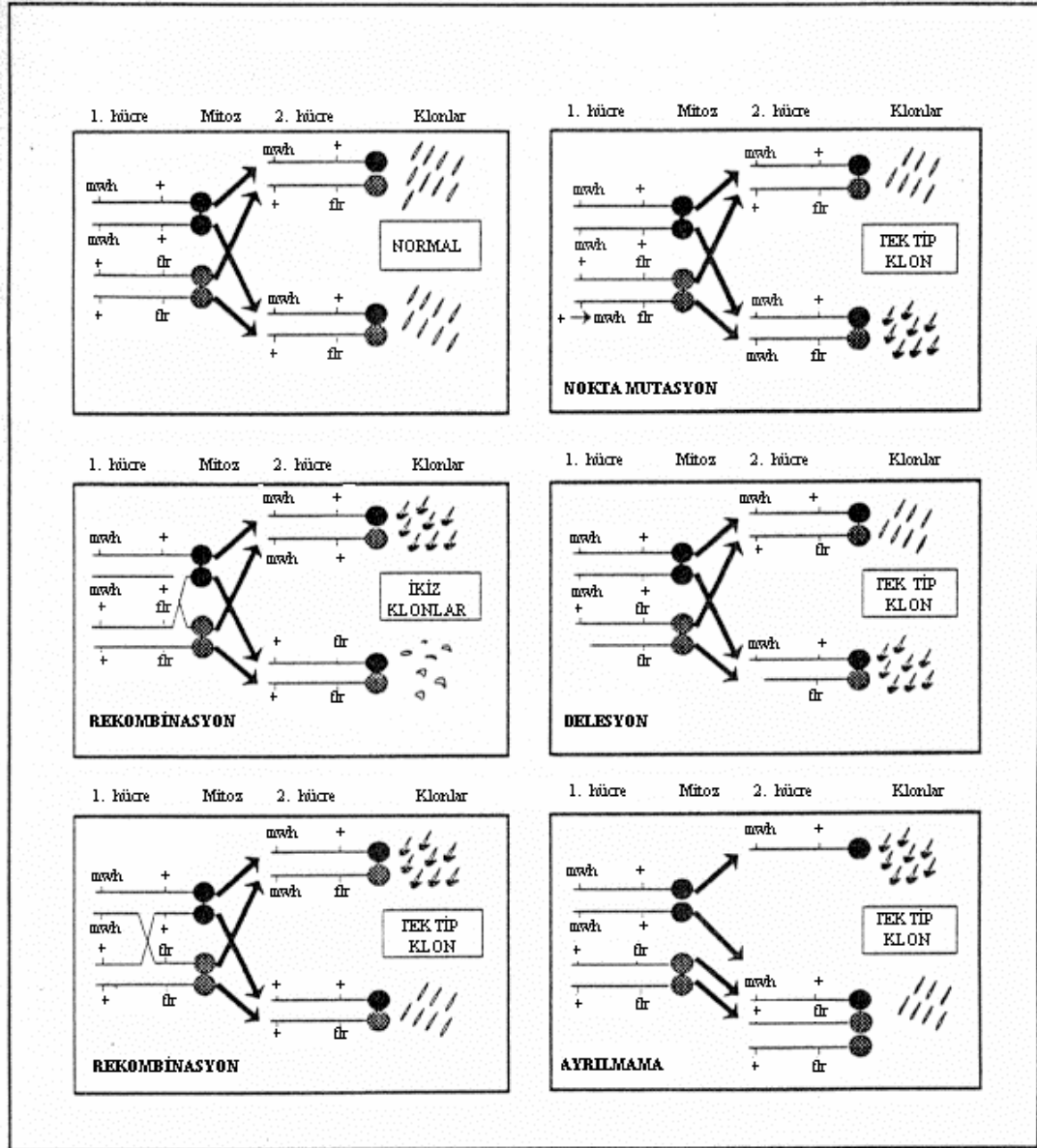
Şekil 2.11. Küçük tek tip mwh mutant klonların görünümü



Şekil 2.12. İkiz mutant klonların görünümü



Şekil 2.13. Büyük tek tip flr mutant klonların görünümü



Şekil 2.14. mwh/flr^3 genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anomaliler

2.9. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması

Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır (Szabad vd 1983).

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

Sadece mwh klonlar göz önüne alınırsa, denklemdaki “ f ” mwh klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, “ n ” gözlenen toplam mwh klon sayısını, “ N ” analiz edilen kanat sayısını ve “ C ” bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarla bu sayının 24.400 olduğu belirlenmiştir (Garcia-Bellido ve Merriam 1971).

Yapılan çaprazlamalar sonucunda oluşan bireyler kanat bakımından normal ve serrat kenarlı olmak üzere iki farklı fenotipte gözlenmektedir. Serrat kenarlı kanatlara sahip bireylerde bulunan dengeleyici (balancer) kromozomun varlığı, bu kromozom parçası üzerine yerleştirilmiş dominant mutant bir gen olan Serrate (Ser) sayesinde tespit edilebilmektedir. Dengeleyici kromozomun (TM3) rekombinasyonu baskılaması nedeniyle bu fenotipe sahip bireylerde gözlenen mutant klonlar sadece mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Böylece serrat kenarlı kanatlardan elde edilen verilerle normal kenarlı kanatlardan elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla çalışılan etmenin mutajenik ve/veya rekombinojenik etkileri ayrı ayrı tespit edilebilmektedir (Frei vd 1985, Pimentel vd 1991, Tripaty vd 1991, Zordan vd 1991, 1994, Vogel 1992, Katz ve Foley 1993, Rodriguez-Arnaiz vd 1993, Marec ve Gelbic 1994, Rozenkranz ve Klogman 1996, Gonzales-Cezar ve Ramos-Morales 1997).

Normal ile serrat kanatlardan elde edilen verilerin karşılaştırılmasıyla gerçekleşen rekombinasyon yüzdesi şu şekilde hesaplanmaktadır.

$$\% \text{ rekombinasyon} = \frac{a - b}{b} \times 100$$

formülde;

a: normal fenotipteki kanatlarda gözlenen mwh sektörlerinin frekansı

b: serrat fenotipteki kanatlarda gözlenen mwh sektörlerinin frekansı

2.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Sayımlar sonucunda elde edilen veriler *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış olan bilgisayar programı (Microsta) yardımıyla değerlendirildi. Değerlendirme yapılmadan önce iki farklı hipotez kuruldu. Orijinal (null) hipotez (H_0)’da uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez (H_A)’da ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan m defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orijinal ve alternatif hipotezler Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplandı.

Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (n_i) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_0 red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (n_c) mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse H_A red edildi. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesinde karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) çizelgesinden yararlanıldı.

Değerlendirmenin nasıl yapıldığı Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (Selby ve Olson 1981, Frei ve Würzler 1988).

Çizelge 2.2: Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi

HİPOTEZLER		H_A	
		KABUL ($1-\beta$)	RED (β)
H_0	KABUL ($1-\alpha$)	ÖNEMSİZ FARK $P=(1-\alpha)(1-\beta)=1-\alpha-\beta+\alpha\beta$	NEGATİF $P=(1-\alpha)\beta=\beta-\alpha\beta$
	RED (α)	POZİTİF $P=\alpha(1-\beta)=\alpha-\alpha\beta$	ZAYIF POZİTİF $P=\alpha\beta$

Bu değerlendirmelerle sonuçlar; H_0 ve H_A ’nın kabul veya red edilmesine göre Çizelge 2.2. kullanılarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak değerlendirildi.

3. BULGULAR

3.1. *D. melanogaster* Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Kullanılarak Mutajenite ve Rekombinojenitenin Belirlenmesi

Drosophila kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile genotoksikolojik özellikleri değerlendirilen Benzil türevlerinden elde edilen bütün sonuçlar Çizelge 3.1–3.8’de, klon frekans dağılımları ise Şekil 3.1–3.8’de gösterilmiştir. Benzil türevlerinin genotoksikolojik özellikleri değerlendirilirken her bir derişim için, dengeleyici kromozom (TM3) taşıyan serrat kanatlı bireylerden ve dengeleyici kromozom taşımayan normal kanatlı bireylerden 80 kanadın preparatı hazırlanarak incelenmiştir. Bu çalışmada toplam 4 144 kanadın mikroskop altında incelenmesi yapılmıştır.

3.1.1. Kontrol grupları

3.1.1.1. Distile su ve Etil metan sülfonat (EMS)

Distile su uygulamasında, *D. melanogaster*’in normal kanatlı (mwh/flr³) bireylerine ait 80 kanatta 16 adet küçük tek tip klon, 1 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplam 17 adet klon belirlenirken ikiz klona rastlanmamıştır. Toplam mwh klon sayısı ise 17 olarak bulunmuştur. *D. melanogaster*’in serrat kanatlı bireylerine ait 76 kanatta ise 17 adet küçük tek tip klon, 2 adet büyük tek tip klon olmak üzere toplam 19 adet klon belirlenirken ikiz klona rastlanmamıştır. Toplam mwh klon sayısı ise 19 olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.1–3.8).

Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı *D. melanogaster*’in normal kanatlı bireyleri için 0.87, serrat kanatlı bireyleri için 1.02 olarak bulunmuştur (Bkz. Çizelge 3.1-3.8).

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan ve daha önceki çalışmalarda (Graf vd 1984, Kaya 2000) genotoksik olduğu belirlenmiş olan Etil metan sülfonat (EMS) uygulamalarının sonucunda, *D. melanogaster*’in normal ve serrat kanatlı bireylerde pozitif sonuçlar gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.1–3.8).

3.1.2. Benzil Türevleri

3.1.2.1. Benzaldehit

Benzaldehit, *D. melanogaster* 3. evre larvalarına 0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM'lık derişimlerde uygulanmıştır.

Normal kanatlı bireylerde 0.1 ve 0.5 mM'lık derişimler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermezken 1, 10, 25 ve 50 mM derişimler aynı klonlar bakımından pozitif sonuçlar göstermiştir (Bkz. Çizelge 3.1). Büyük tek tip klonlarda sadece 10 mM'lık derişimde pozitif sonuç bulunurken diğer derişimlerde istatistiksel anlamda önemli bir fark bulunamamıştır. İkiz klonlar karşılaştırıldığında tüm derişimler kontrol grubundan istatistiksel anlamda farklı değildir (Bkz. Çizelge 3.1).

Serrat kanatlı bireylerde 25 ve 50 mM'lık derişimler küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için pozitif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlar istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.2). 0.1 mM'lık derişimde küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlardan negatif sonuçlar elde edilirken büyük tek tip klonlar istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir. 0.5, 1 ve 10 mM'lık derişimler ise tüm kategoriler için istatistiksel anlamda farklı değildir (Bkz. Çizelge 3.2).

Çizelge 3.1. Benzaldehit'in *Drosophila melanogaster*'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

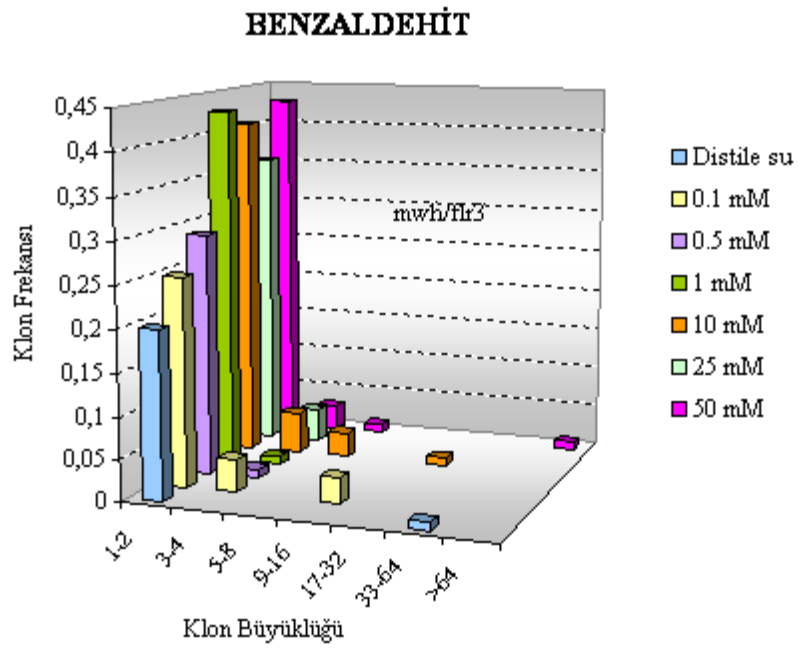
Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon
																	Frekans
																	(10 ⁵ hücre)
Normal Kanat (mwh/flr ³)																	
Distile su	80	16	(0.20)		1	(0.01)		0	(0.00)		17	(0.21)		17	(0.21)		0.87
1 mM EMS	80	163	(2.04)	+	89	(1.11)	+	32	(0.40)	+	273	(3.41)	+	284	(3.55)	+	13.99
0.1	80	20	(0.25)	i	5	(0.06)	i	1	(0.01)	i	26	(0.33)	i	26	(0.33)	i	1.33
0.5	80	23	(0.29)	i	1	(0.01)	i	0	(0.00)	i	24	(0.30)	i	24	(0.30)	i	1.23
1	80	34	(0.43)	+	1	(0.01)	i	0	(0.00)	i	35	(0.44)	+	35	(0.44)	+	1.79
10	80	33	(0.41)	+	7	(0.09)	+	2	(0.03)	i	42	(0.53)	+	42	(0.53)	+	2.15
25	80	29	(0.36)	+	3	(0.04)	i	2	(0.03)	i	34	(0.43)	+	34	(0.43)	+	1.74
50	80	34	(0.43)	+	4	(0.05)	i	4	(0.05)	i	42	(0.53)	+	42	(0.53)	+	2.15

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

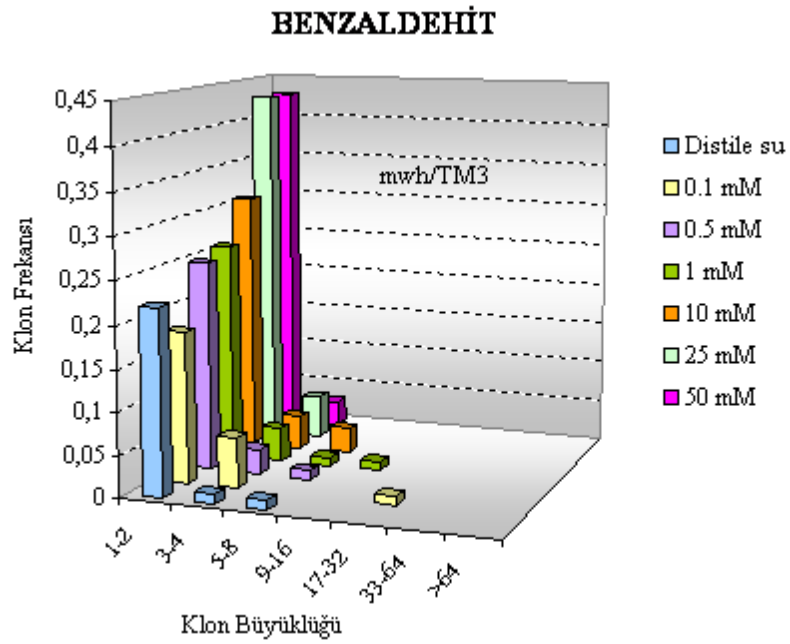
Çizelge 3.2. Benzaldehit'in *Drosophila melanogaster*'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon
																	Frekans (10 ⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Serrat Kanat (mwh/TM3)																	
Distile su	76	17	(0.22)		2	(0.03)					19	(0.25)		19	(0.25)		1.02
1 mM EMS	80	63	(0.79)	+	30	(0.38)	+				85	(1.06)	+	93	(1.16)	+	4.35
0.1	80	14	(0.18)	-	6	(0.08)	i				20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02
0.5	80	20	(0.25)	i	3	(0.04)	i				23	(0.29)	i	23	(0.29)	i	1.18
1	80	21	(0.26)	i	5	(0.06)	i				26	(0.33)	i	26	(0.33)	i	1.33
10	80	25	(0.31)	i	5	(0.06)	i				30	(0.38)	i	30	(0.38)	i	1.54
25	80	34	(0.43)	+	4	(0.05)	i				38	(0.48)	+	38	(0.48)	+	1.95
50	80	34	(0.43)	+	2	(0.03)	i				36	(0.45)	+	36	(0.45)	+	1.84

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 3.1. Benzaldehit'in (normal kanat) klon frekans dağılımı



Şekil 3.2. Benzaldehit'in (serrat kanat) klon frekans dağılımı

3.1.2.2. Benzil asetat

Benzil asetat, *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM'lık derişimlerde uygulanmıştır.

Normal kanatlı bireylerde 10, 25 ve 50 mM'lık derişimler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlarda genotoksik etkiler gözlenirken büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlar bu derişimlerde istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.3). 0.1 mM'lık derişim küçük tek tip klonlar ve toplam klonlar için negatif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlar, ikiz klonlar ve toplam *mwh* klonlar istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.3). 0.5 ve 1 mM'lık derişimler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tüm klon tipleri istatistiksel anlamda kontrol grubundan farklı değildir (Bkz. Çizelge 3.3).

Serrat kanatlı bireylerde 0.5 mM'lık derişim büyük tek tip klonlar için pozitif etki gösterirken küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar negatif etkiler göstermiştir (Bkz. Çizelge 3.4). 50 mM'lık derişim ise büyük tek tip klonlar için pozitif sonuç gösterirken küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.4). Diğer derişimlerde ise tüm kategorilerde ya istatistiksel anlamda önemsiz farklar ya da negatif sonuçlar elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Benzil asetat'ın *Drosophila melanogaster*'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

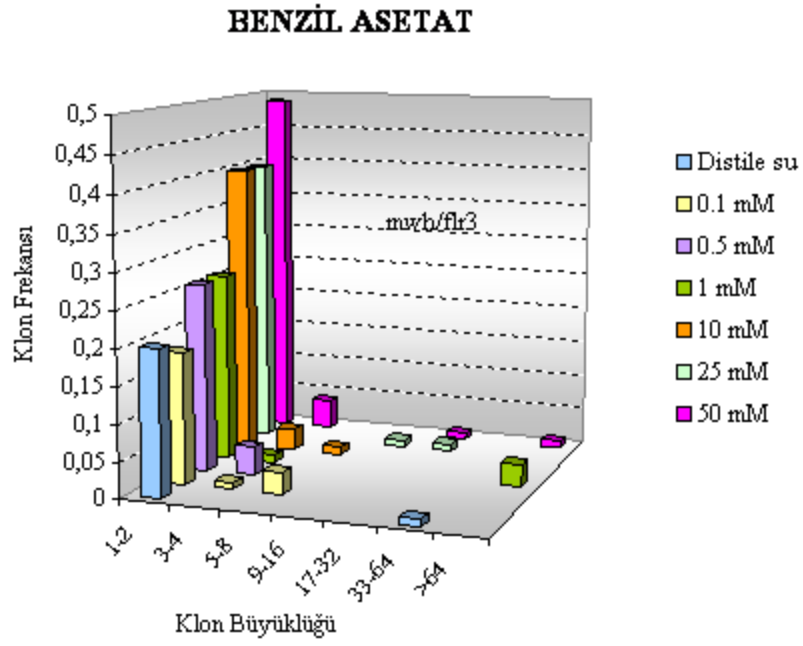
Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon
																	Frekans
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	(10 ⁵ hücre)
Normal Kanat (mwh/flr ³)																	
Distile su	80	16	(0.20)		1	(0.01)		0	(0.00)		17	(0.21)		17	(0.21)		0.87
1 mM EMS	80	163	(2.04)	+	89	(1.11)	+	32	(0.40)	+	273	(3.41)	+	284	(3.55)	+	13.99
0.1	80	14	(0.18)	-	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	18	(0.23)	i	18	(0.23)	-	0.92
0.5	80	21	(0.26)	i	3	(0.04)	i	0	(0.00)	i	24	(0.30)	i	24	(0.30)	i	1.23
1	80	21	(0.26)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	23	(0.29)	i	25	(0.31)	i	1.18
10	80	32	(0.40)	+	3	(0.04)	i	0	(0.00)	i	35	(0.44)	+	35	(0.44)	+	1.79
25	80	32	(0.40)	+	2	(0.03)	i	0	(0.00)	i	34	(0.43)	+	34	(0.43)	+	1.74
50	80	39	(0.49)	+	5	(0.06)	i	1	(0.01)	i	45	(0.56)	+	45	(0.56)	+	2.31

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

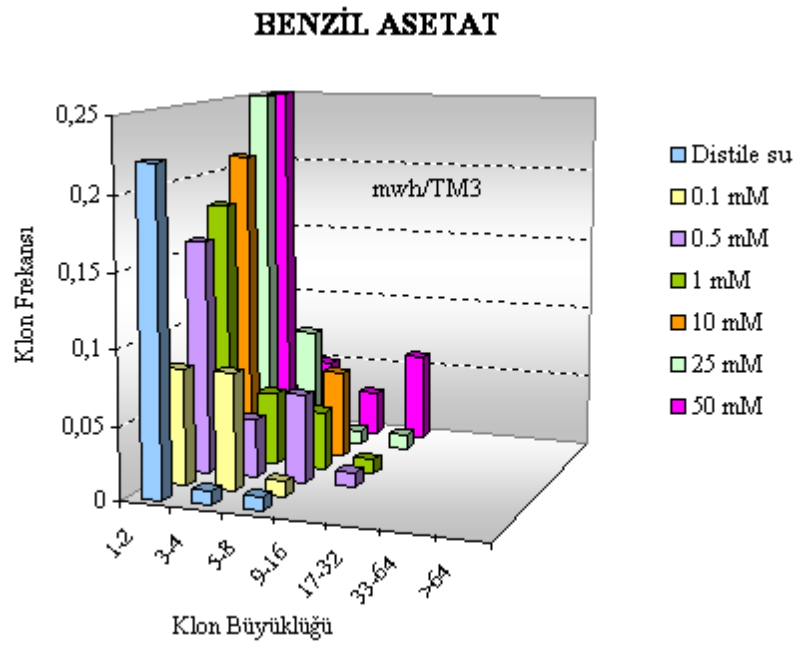
Çizelge 3.4. Benzil asetat'ın *Drosophila melanogaster*'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon Frekansısı (10 ⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Serrat Kanat (mwh/TM3)																	
Distile su	76	17	(0.22)		2	(0.03)					19	(0.25)		19	(0.25)		1.02
1 mM EMS	80	63	(0.79)	+	30	(0.38)	+				85	(1.06)	+	93	(1.16)	+	4.35
0.1	80	6	(0.08)	-	7	(0.09)	i				13	(0.16)	-	13	(0.16)	-	0.67
0.5	80	13	(0.16)	-	9	(0.11)	+				22	(0.28)	-	22	(0.28)	-	1.13
1	80	14	(0.18)	-	8	(0.10)	i				22	(0.28)	-	22	(0.28)	-	1.13
10	68	14	(0.21)	-	5	(0.07)	i				19	(0.28)	i	19	(0.28)	i	1.15
25	80	20	(0.25)	i	8	(0.10)	i				28	(0.35)	i	28	(0.35)	i	1.43
50	80	20	(0.25)	i	11	(0.14)	+				31	(0.39)	i	31	(0.39)	i	1.59

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 3.3. Benzil asetat'ın (normal kanat) klon frekans dağılımı



Şekil 3.4. Benzil asetat'ın (serrat kanat) klon frekans dağılımı

3.1.2.3. Benzil alkol

Benzil alkol, *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM'lık derişimlerde uygulanmıştır.

Normal kanatlı bireylerde 50 mM'lık derişim kontrol grubu ile karşılaştırıldığında küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar pozitif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlar bu derişimde istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.5). 10 mM'lık derişim tüm klonlar bakımından istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemektedir. 25 mM'lık derişimde küçük tek tip klon negatif sonuç gösterirken diğer klon tipleri için kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.5). 0.1, 0.5 ve 1 mM'lık derişimler küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar negatif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlar bu derişimlerde istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.5).

Serrat kanatlı bireylerde 1, 10 ve 50 mM'lık derişimler büyük tek tip klonlar için pozitif sonuçlar elde edilirken küçük tek tip klonlar için negatif sonuçlar elde edilmiştir. Aynı derişimlerden ise, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için istatistiksel anlamda önemli bir fark elde edilememiştir (Bkz. Çizelge 3.6). 0.1, 0.5 ve 25 mM'lık derişimler küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlarda negatif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlarda ise istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.6).

Çizelge 3.5. Benzil alkol'ün *Drosophila melanogaster*'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon
																	Frekans
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	(10 ⁵ hücre)
Normal Kanat (mwh/flr ³)																	
Distile su	80	16	(0.20)		1	(0.01)		0	(0.00)		17	(0.21)		17	(0.21)		0.87
1 mM EMS	80	163	(2.04)	+	89	(1.11)	+	32	(0.40)	+	273	(3.41)	+	284	(3.55)	+	13.99
0.1	80	16	(0.20)	-	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
0.5	80	10	(0.13)	-	3	(0.04)	i	0	(0.00)	i	13	(0.16)	-	13	(0.16)	-	0.67
1	80	6	(0.08)	-	6	(0.08)	i	0	(0.00)	i	12	(0.15)	-	12	(0.15)	-	0.61
10	80	21	(0.26)	i	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	25	(0.31)	i	25	(0.31)	i	1.28
25	80	15	(0.19)	-	3	(0.04)	i	1	(0.01)	i	19	(0.24)	i	19	(0.24)	i	0.97
50	80	34	(0.43)	+	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	36	(0.45)	+	36	(0.45)	+	1.84

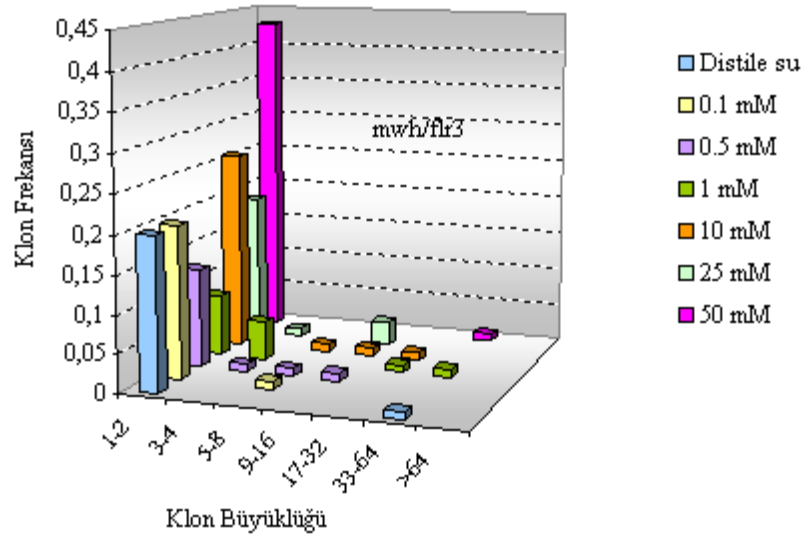
Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

Çizelge 3.6. Benzil alkol'ün *Drosophila melanogaster*'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon Frekansısı (10 ⁵ hücre)
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Serrat Kanat (mwh/TM3)																	
Distile su	76	17	(0.22)		2	(0.03)					19	(0.25)		19	(0.25)		1.02
1 mM EMS	80	63	(0.79)	+	30	(0.38)	+				85	(1.06)	+	93	(1.16)	+	4.35
0.1	80	10	(0.13)	-	6	(0.08)	i				16	(0.20)	-	16	(0.20)	-	0.82
0.5	80	17	(0.21)	-	4	(0.05)	i				21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08
1	80	11	(0.14)	-	13	(0.16)	+				24	(0.30)	i	24	(0.30)	i	1.23
10	80	9	(0.11)	-	20	(0.25)	+				29	(0.36)	i	29	(0.36)	i	1.49
25	80	16	(0.20)	-	5	(0.06)	i				21	(0.26)	-	21	(0.26)	-	1.08
50	80	11	(0.14)	-	14	(0.18)	+				25	(0.31)	i	25	(0.31)	i	1.28

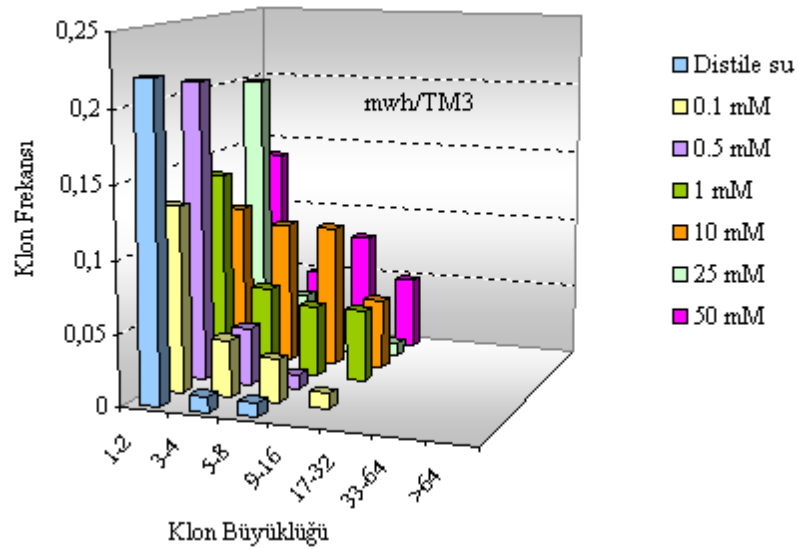
Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

BENZİL ALKOL



Şekil 3.5. Benzil alkol'ün (normal kanat) klon frekans dağılımı

BENZİL ALKOL



Şekil 3.6. Benzil alkol'ün (serrate kanat) klon frekans dağılımı

3.1.2.4. Benzoik asit

Benzoik asit, *D. melanogaster* larvalarına 0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM'lık derişimlerde uygulanmıştır.

Normal kanatlı bireylerde 50 mM'lık derişim kontrol grubu ile karşılaştırıldığında küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlarda genotoksik sonuçlar elde edilirken büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlar bu derişimde istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.7). 0.1 ve 0.5 mM'lık derişimlerde küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar negatif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlar ve ikiz klonlar bu derişimlerde istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.7). 1 ve 10 mM'lık derişimlerde ise sadece küçük tek tip klonlarda negatif sonuçlar gözlenirken diğer tüm kategorilerde istatistiksel anlamda önemli bir fark gözlenmemiştir. 25 mM'lık derişimde tüm klon tipleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda önemli değildir (Bkz. Çizelge 3.7).

Serrat kanatlı bireylerde 0.1, 0.5, 1, 10, 25 ve 50 mM'lık derişimler küçük tek tip klonlar, toplam *mwh* klonlar ve toplam klonlar için negatif sonuçlar gösterirken büyük tek tip klonlarda istatistiksel anlamda önemli bir fark göstermemiştir (Bkz. Çizelge 3.8).

Çizelge 3.7. Benzoik asit'in *Drosophila melanogaster*'in Normal Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

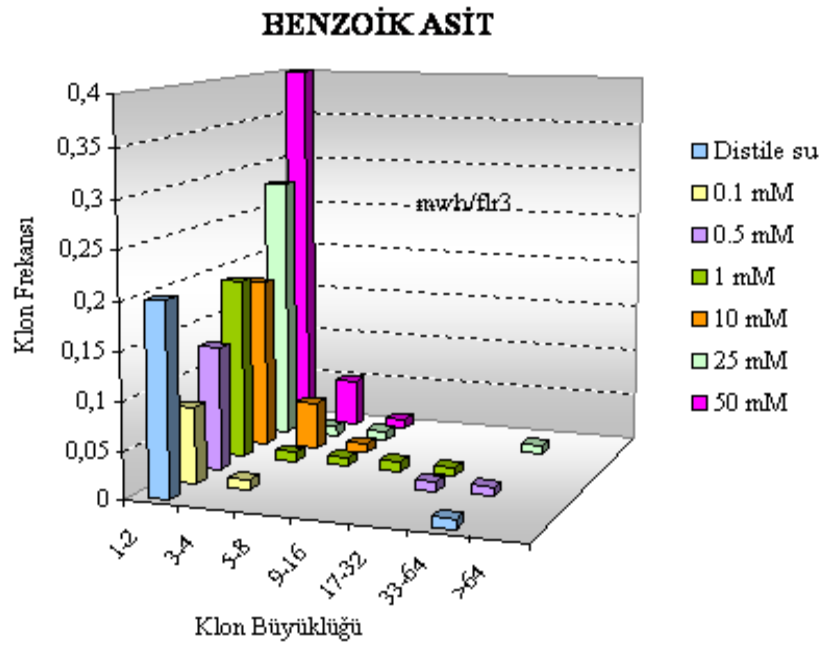
Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon
																	Frekans
		No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	(10 ⁵ hücre)
Normal Kanat (mwh/flr ³)																	
Distile su	80	16	(0.20)		1	(0.01)		0	(0.00)		17	(0.21)		17	(0.21)		0.87
1 mM EMS	80	163	(2.04)	+	89	(1.11)	+	32	(0.40)	+	273	(3.41)	+	284	(3.55)	+	13.99
0.1	80	6	(0.08)	-	1	(0.01)	i	1	(0.01)	i	8	(0.10)	-	8	(0.10)	-	0.41
0.5	80	10	(0.13)	-	2	(0.03)	i	1	(0.01)	i	13	(0.16)	-	13	(0.16)	-	0.67
1	80	15	(0.19)	-	4	(0.05)	i	2	(0.03)	i	20	(0.25)	i	21	(0.26)	i	1.02
10	80	14	(0.18)	-	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	19	(0.24)	i	19	(0.24)	i	0.97
25	80	22	(0.28)	i	3	(0.04)	i	0	(0.00)	i	25	(0.31)	i	25	(0.31)	i	1.28
50	80	32	(0.40)	+	5	(0.06)	i	0	(0.00)	i	37	(0.46)	+	37	(0.46)	+	1.90

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.

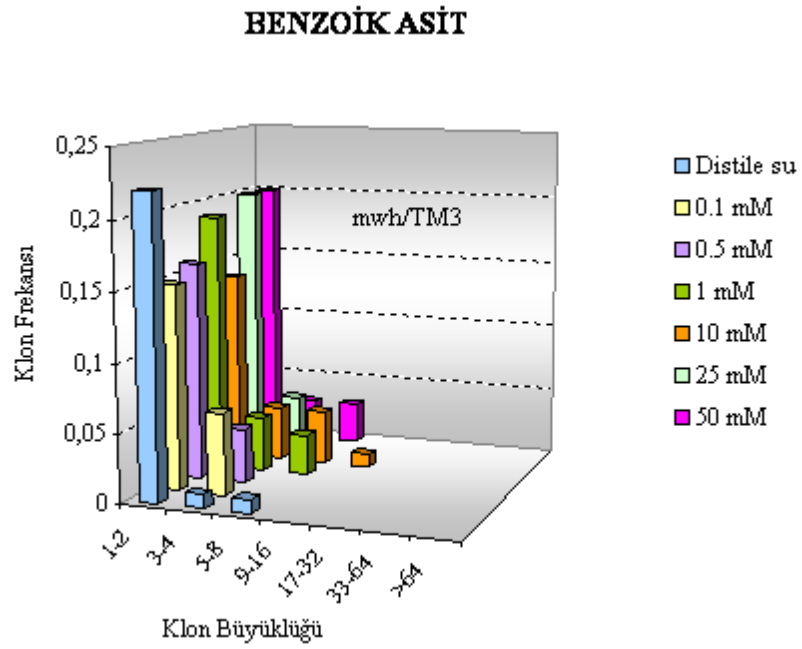
Çizelge 3.8. Benzoik asit'in *Drosophila melanogaster*'in Serrat Kanatlı Bireylerinde Somatik Mutasyon ve Rekombinasyona Etkileri

Derişimler (mM)	Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (<i>m</i> =2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (<i>m</i> =5)			İkiz klonlar (<i>m</i> =5)			Toplam mwh klonları (<i>m</i> =2)			Toplam klonları (<i>m</i> =2)			Klon İndüksiyon
																	Frekans
																	(10 ⁵ hücre)
Serrat Kanat (mwh/TM3)																	
Distile su	76	17	(0.22)		2	(0.03)					19	(0.25)		19	(0.25)		1.02
1 mM EMS	80	63	(0.79)	+	30	(0.38)	+				85	(1.06)	+	93	(1.16)	+	4.35
0.1	80	12	(0.15)	-	5	(0.06)	i				17	(0.21)	-	17	(0.21)	-	0.87
0.5	80	13	(0.16)	-	3	(0.04)	i				16	(0.20)	-	16	(0.20)	-	0.82
1	80	15	(0.19)	-	5	(0.06)	i				20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02
10	80	11	(0.14)	-	7	(0.09)	i				18	(0.23)	-	18	(0.23)	-	0.92
25	80	16	(0.20)	-	3	(0.04)	i				19	(0.24)	-	19	(0.24)	-	0.97
50	80	16	(0.20)	-	4	(0.05)	i				20	(0.25)	-	20	(0.25)	-	1.02

Fr., frekans; D., istatistik sonuçlarının gösterimi: +, pozitif; -, negatif; i, önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05.



Şekil 3.7. Benzoik asit'in (normal kanat) klon frekans dağılımı



Şekil 3.8. Benzoik asit'in (serrate kanat) klon frekans dağılımı

4. TARTIŞMA

Gıda katkı maddelerinin gıda endüstrisinde kullanımı teknolojik gereksinimlerden kaynaklanmıştır. Ancak bunun yanı sıra; dünya nüfusundaki artışlar, gıda sektörünü besleyen hammadde kaynaklarındaki azalmalar, insanların yaşam standartlarını yükseltme eğilimleri gibi etmenler teknolojik buluşları yönlendirmiştir. Gıda sektörüne yeni ve üstün teknolojilerin kazandırdığı değişik üretim teknikleri, buna göre ürünlerin çeşitlenmesi, tüketici beğenisinin değişmesi ve bilinçlenmesi, mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması, ürünlerde raf ömrünün uzatılması ve kalitede standardizasyon zorunluluğu, daralan gıda kaynaklarının rasyonel kullanımı gibi hususlar gıda endüstrisinde kullanılan tekniklerin yanı sıra gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Gıda katkı maddeleri, gıda üretiminde 32 değişik amaçla kullanılmaktadır (Kotsonis vd 2001). Bu kullanım amaçlarından bazıları renklendiriciler, koruyucular, antioksidanlar, asitliği düzenleyiciler, emülgatörler, stabilizörler, lezzet arttırıcılar ve tatlandırıcılar şeklindedir. Benzil türevleri gıdalarda ve içeceklerde lezzet vermek amacıyla kullanılan katkı maddeleridir. Benzil türevlerinin kullanımındaki bilinçsizlik nedeniyle dünyanın birçok yerinde araştırmalarla belirlenmiş uygun derişimin üzerinde kullanıldığı görölmektedir. Benzil türevlerinin belirlenmiş uygun dozdan daha fazla miktarda kullanılması sağlık açısından; toksik, mutajenik, kanserojenik ve teratojenik etkileri bakımından oldukça önemlidir.

Bu çalışmada, gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılan 4 Benzil türevinin (Benzaldehit, Benzil asetat, Benzil alkol ve Benzoik asit) *D. melanogaster*'de mutajenik ve rekombinojenik etkileri araştırıldı. Bu çalışmada kullanılan benzil türevlerinin genotoksik etkilerinin farklı test sistemleri kullanılarak değerlendirildiği çalışmalardan elde edilen sonuçlara bakıldığında kullanılan test sistemine bağlı olarak oldukça farklı sonuçların elde edildiği görölmektedir.

Benzaldehit, gıdalarda tatlandırıcı amacıyla kullanılmasının yanı sıra ayrıca, parfüm, kolonya, saç spreyi, çamaşır suyu, deodorantlarda, deterjanlarda, traş kreminde, şampuanlarda ve diş macunlarında kullanılan bir benzil türevidir (<http://users.lmi.net/wilworks/ehn20.htm>). Plastik katkı maddesi olarak eczacılıkta ve

bazı anilin boyalarının hazırlanmasında da kullanılmaktadır (<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/benzaldehyde.htm>). Lezzet ve Ekstrakt Sanayicileri Birliği (FEMA= Flavor and Extract Manufacturers Association)'ne göre besinlerin yapısında doğal olarak bulunan Benzaldehit'in yıllık miktarı 57 956 kg'dır. Gıdalarda lezzet maddesi (tatlandırıcı) olarak kullanılan yıllık miktarı ise 273 516 kg'dır. Bir günde sadece gıdaların tüketilmesi ile maruz kalınan miktar insan vücut ağırlığının kilogramı (kg) başına 600 µg'dır (Adams vd 2005). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre günlük alınabilir miktar 0–5 mg/kg olarak belirlenmiştir (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_194.htm).

Benzaldehit'in fareler (B6C3F₁) ve sıçanlara (F344/N) uygulanarak yapıldığı kısa ve uzun süreli toksisite çalışmalarda kullanılan dozlara bağlı olarak vücut ağırlığında azalma, böbrek tübüler epitelyal dejenerasyonu, karaciğer dejenerasyonu, renal tüp dejenerasyonu, ön midede hiperplazi, hiperkeratosis ve beyincikte nekroz gözlenmiştir (NTP 1990a, b). Benzaldehit'in genotoksik etkilerini saptamak için daha önce yapılmış olan çalışmalara bakıldığında ise, Benzaldehit'in genotoksikolojik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, kullanılan organizmalara ve kullanılan test sistemlerine bağlı olarak farklı sonuçlar elde edilmiştir. *S. typhimurium*'un sekiz suşu (TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537, TA1538 ve TA2637) ile yapılan *in vitro* mutajenite (Ames) testinde bu benzil türevi için negatif sonuçlar elde edilmiştir (Heck vd 1989, Rockwell ve Raw 1979, Nohmi vd 1985, Haworth vd 1983, NTP 1990a 1990b, Vamvakas vd 1989). *B. subtilis*'in H17 ve M45 hatları kullanılarak yapılan rekombinasyon testinde Benzaldehit negatif sonuç vermiştir (Oda vd 1979). Oysa Matsui vd (1989), aynı testi kullanarak yaptıkları çalışmada kullanılan derişime bağlı olarak Benzaldehit'in pozitif sonuç verdiğini göstermişlerdir. Sıçan hepatositlerinde *in vitro* koşullarda programlanmamış DNA sentezi çalışmasında (Heck vd 1989), Çin kobaylarının ovaryum (CHO) hücreleri kullanılarak yapılan kromozomal aberasyon testinde (Galloway vd 1987) ve kardeş kromatidlerde parça değişimi (sister chromatid exchange=SCE) testi (Sasaki vd 1989) ile Benzaldehit'in mutajenik etkilerinin araştırıldığı çalışmalarda bu benzil türevinin mutajenik olmadığı belirlenmiştir. Fare L5178Y lenfoma hücrelerinde *in vitro* koşullarda mutasyon testinde (Heck vd 1989, McGregor vd 1991), CHO hücreleri kullanılarak yapılan kromozomal aberasyon

testinde (Sofuni vd 1985, Kasamaki vd 1982) ve CHO hücreleri ve insan lenfositleri kullanılarak yapılan kardeş kromatidlerde parça değişimi testlerinde (Galloway vd 1987, Jansson vd 1988) pozitif sonuçlar elde edilmiştir. *İn vivo* bir test olan *Drosophila* eşeye bağlı resesif letal mutasyon testinde ise, uygulama gruplarının kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur (Woodruff vd 1985). Bizim çalışmamızdan elde edilen verilere göre, Benzaldehit'in kullanılan derişimlerinin mutajenik ve/veya rekombinojenik olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre; Benzaldehit derişimlerinin kullanılan testde genotoksik olduğunu gösteren sonuçlarla daha önceki birçok çalışmalardan elde edilen pozitif sonuçların aynı doğrultuda olduğu görülmektedir. Ayrıca bu çalışmadan elde edilen bulgular, bu benzil türevinin daha önce bu test ile değerlendirilmemiş olması nedeniyle ayrı bir önem taşımaktadır.

Benzil asetat, gıdalara lezzet vermek amacıyla kullanılırken ayrıca, parfüm, kolonya, şampuanlarda, saç spreyi, deodorantlarda, deterjanlarda, sabunlarda, kumaşlarda yumuşatıcı olarak ve diş macunlarında kullanılan bir benzil türevidir (<http://users.lmi.net/wilworks/ehn20.htm>). Yağ, mürekkep, vernik, reçine ve plastiklerde çözücü bir ajan olarak da kullanılmaktadır (<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/benzyl%20acetate.htm>).

FEMA'ya göre besinlerin yapısında doğal olarak bulunan Benzil asetat'ın yıllık miktarı 3453 kg'dır. Gıdalarda lezzet maddesi (tatlandırıcı) olarak kullanılan yıllık miktarı ise 6486 kg'dır. Bir günde sadece gıdaların tüketilmesi ile maruz kalınan miktar insan vücut ağırlığının kilogramı başına 14 µg'dır (Adams vd 2005). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre günlük alınabilir miktar 0–5 mg/kg olarak belirlenmiştir (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_194.htm).

Benzil asetat, farelerde ve sıçanlarda yapılan kısa ve uzun süreli toksisite çalışmalarında, yüksek dozlarda ataksi, titreme, durgunluk, inaktivite, vücut ağırlığında azalma, seminifer tübüllerde atrofi ve aspermatogenesisi içeren testiküler değişiklikler, solunum güçlüğü, hipokampal nekroz, beyin lezyonları, hepatosellüler nekroz, beyinde hemoraji, fetal vücut ağırlığında azalma, iskelet ve internal (iç) malformasyonlar ve vücut sıcaklığında düzensizliklere neden olmuştur (NTP 1986, NTP 1993a, Ishiguro vd 1993). Benzil asetat'ın genotoksik etkilerini saptamak için daha önce yapılmış olan

alışmalara bakıldığında hem pozitif hem de negatif sonuçların varlığı dikkati çekmektedir. *S. typhimurium*'un dört suşu (TA98, TA100, TA1535 ve TA1537) ile yapılan *in vitro* mutajenite testinde (Mortelmans vd 1986, Schunk vd 1986, Florin vd 1980), *B. subtilis*'in H17 ve M45 hatları kullanılarak yapılan rekombinasyon testinde (Oda vd 1979), *E. coli* WP2 uvrA kullanılarak yapılan mutasyon testinde (Yoo vd 1986), CHO kullanılarak yapılan kromozomal aberasyonlar testinde ve kardeş kromatidlerde parça değişimi testinde (Galloway vd 1987) ve sıçan hepatositlerinde *in vitro* koşullarda programlanmamış DNA sentezi çalışmasında (Mirsalis vd 1983) negatif sonuçlar elde edilmiştir. Fare lenfoma L5178Y hücreleri ve insan lenfoblast TK6 hücreleri kullanılarak yapılan mutasyon testinde ise Benzil asetat mutajenik etki göstermiştir (Caspary vd 1988, McGregor vd 1988, Rudd vd 1983). *In vivo* da yapılan çalışmalarda ise, *Drosophila* eşeeye bağlı resesif letal mutasyon testi (NTP 1993a, Foureman vd 1994), fare kemik iliği hücrelerinde kardeş kromatidlerde parça değişimi çalışmasında (NTP 1993a), fare kemik iliği hücreleri ve fare eritrositleri kullanılarak yapılan mikronükleus testinde (NTP 1993a, Shelby vd 1993), sıçan hepatositlerinde ve sıçan pankreatik hücrelerinde programlanmamış DNA sentezi çalışmasında (Mirsalis vd 1983 1989, Steinmetz ve Mirsalis 1984) ve sıçan pankreatik hücrelerindeki DNA hasarı testinde (Longnecker vd 1990) negatif sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan makale araştırmalarında Benzil asetat'ın *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak genotoksik etkisinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre Benzil asetat *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinde rekombinasyonu tetikleemiştir.

Benzil alkol, gıdalara lezzet vermek amacıyla kullanılırken ayrıca, parfüm, kolonya, şampuanlarda, sa spreyi, çamaşır suyu, deodorantlarda, deterjanlarda, sabunlarda, kumaşlarda yumuşatıcı olarak ve losyonlarda kullanılan bir benzil türevidir (<http://users.lmi.net/wilworks/ehn20.htm>). Mürekkep, boya ve verniklerde çözücü olarak kullanılan Benzil alkol ayrıca bakteriyostatik etkisinden dolayı eczacılıkta da kullanılmaktadır (<http://www.chemicaland21.com/industrialchem/solalc/benzyl%20alcohol.htm>).

FEMA'ya göre besinlerin yapısında doğal olarak bulunan Benzil alkol'ün yıllık miktarı 7099 kg'dır. Gıdalarda lezzet maddesi (tatlandırıcı) olarak kullanılan yıllık miktarı ise 130 635 kg'dır. Bir günde sadece gıdaların tüketilmesi ile maruz kalınan miktar insan vücut ağırlığının kilogramı başına 287 µg'dır (Adams vd 2005). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre günlük alınabilir miktar 0–5 mg/kg olarak belirlenmiştir (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_194.htm).

Benzil alkol ile ilgili kısa ve uzun süreli toksisite çalışmalarında, vücut ağırlığında azalmalar, sendeleme, uyuşukluk ve solunum güçlüğü gözlenmiştir. Ayrıca hipokampus da nekroz, iskelet kasında nekroz ve böbrek tübüler epitelyumunda dejenerasyonlar da meydana gelmiştir (NTP 1989). Benzil asetat'da olduğu gibi Benzil alkol'ün genotoksik etkilerini saptamak için daha önce yapılmış olan çalışmalara bakıldığında hem pozitif hem de negatif sonuçların varlığı dikkati çekmektedir. *S. typhimurium*'un altı suşu (TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535 ve TA1537) ile yapılan *in vitro* mutajenite testinde (Ishidate vd 1984, Rogan vd 1986, NTP 1989), insan alveolar tümör hücreleri, sıçan hepatositleri ve E. coli P3478 hücreleri kullanılarak yapılan DNA hasarı testinde (Waters vd 1982, Storer vd 1996, Fluck vd 1976) Benzil asetat'ın negatif etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. L5178Y fare lenfoma hücrelerinde mutasyon testinde pozitif sonuçlar gözlenirken (NTP 1989), E. coli WP2 uvrA hattı kullanılarak yapılan mutasyon testinde ise negatif sonuçlar elde edilmiştir (Kuroda vd 1984 b). CHO hücreleri kullanılarak yapılan kromozomal aberasyon testinde benzil alkol'ün etkisi belirsiz ve pozitif olarak bulunurken (Anderson vd 1990, NTP 1989), yine CHO hücreleri kullanılarak yapılan kardeş kromatidlerde parça değişimi testinde Benzil alkol'ün etkisi zayıf pozitif olarak bulunmuştur (NTP 1989, Anderson vd 1990). *In vivo* da yapılan çalışmalarda ise, *Drosophila* eşeye bağlı resesif letal mutasyon testinde (Foureman vd 1994), fare kemik iliği mikronükleus testinde (Hayashi vd 1988) negatif sonuçlar elde edilirken, fare hepatositlerinde replikatif DNA sentezini indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Yoshikawa 1996). *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanılarak yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, Benzil alkol'ün hem rekombinojenik hemde mutajenik etki oluşturduğunu ancak mutajenik etkiyi biraz daha fazla oluşturduğunu göstermektedir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar daha önce yapılmış olan birçok çalışmadan elde edilen sonuçlarla da desteklenmektedir.

Benzoik asit, benzen halkasına bağlanmış karboksil grubu içeren en basit aromatik karboksilik asittir. Alkollü içecekler, fırınlı mamüller, meyve sularında, süt ürünlerinde, margarinlerde, peynir, çiklet, dondurulmuş mandıra ürünleri, yumuşak tatlı ve likör üretiminde, kozmetik ürünlerinde ve ayrıca eczacılıkta öksürüğe karşı antiseptik ve mantara karşı merhem yapımında da kullanılmaktadır. Benzil türevlerinden biri olan Benzoik asit yiyecek ve içeceklerde lezzet vermek amacıyla ve gıdaları koruyucu olarak yukarıdaki ürünlerde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. FEMA'ya göre gıdalarda lezzet maddesi (tatlandırıcı) olarak kullanılan yıllık miktarı ise 2604 kg'dır. Bir günde sadece gıdaların tüketilmesi ile maruz kalınan miktar insan vücut ağırlığının kilogramı başına 6 µg'dır (Adams vd 2005). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' ne göre günlük alınabilir miktar (Allowed Daily Intake =ADI) 0–5 mg/kg olarak belirlenmiştir (http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_194.htm).

Benzoik asit'in çeşitli organizmalardaki zararlı etkilerini saptamak için değişik testler kullanılmıştır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar, kullanılan model organizma ve çalışılan teste bağlı olarak farklılıklar göstermektedir. Yapılan makale araştırmalarında Benzoik asit, *S. typhimurium*'un sekiz suşu (TA97, TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535, TA1537 ve TA1538) ile yapılan *in vitro* mutajenite testinde (Anderson ve Styles 1978, Zeiger vd 1988, Ishidate vd 1984, FDA 1975), *Saccharomyces cerevisiae* D3 ve *S. cerevisiae* D4 hatları kullanılarak yapılan mutasyon testinde (Cotruvo vd 1977, FDA 1975), insan lenfositleri kullanılarak yapılan kardeş kromatidlerde parça değişimini testinde (Jansson vd 1988) negatif sonuçlar göstermiştir. Buna karşın, *B. subtilis*'in H17 ve M45 hatları kullanılarak yapılan rekombinasyon testinde (Nonaka 1989) Benzoik asit pozitif sonuç gösterirken, kobay fibroblast hücreleri kullanılarak yapılan kromozomal aberasyon testinde ise zayıf pozitif etki göstermiştir (Ishidate vd 1984). Gıdalarda lezzet verici ve koruyucu katkı maddesi olarak kullanılan Benzoik asit'in astım, deri döküntüleri, hiperaktiviteye neden olabileceği de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Adams 1992, Yurttagül 1993). Yapılan bir çalışmada Ankara piyasasından sağlanan meyve sularında Benzoik asit

miktarının izin verilen değeri aştığı saptanmıştır (Yentür ve Bayhan 1990). Benzoik asit'in *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (*SMART*) ile genotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada, Benzoik asit 50, 75 ve 100 mM olmak üzere üç farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Uygulanan konsantrasyonlar kontrol grubu (distile su) ile karşılaştırıldığında konsantrasyon artışına bağlı olarak yaşama yüzdesi kontrole oranla önemli ölçüde azalmıştır. Bu da Benzoik asidin toksik etkisinin konsantrasyon arttıkça arttığını göstermektedir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak mutasyon gözlenen kanat yüzdesi ve toplam mutasyon yüzdesinin de arttığı yapılan çalışmada tespit edilmiştir (Sarıkaya ve Solak 2003). Bizim elde ettiğimiz sonuçlara bakıldığında ise, Benzoik asit'in yüksek dozları genel olarak rekombinojenik etkiler göstermektedir. Ancak bu etki 50 mM'lık en yüksek derişimde daha belirgin olarak kendini göstermiştir.

Gıda katkı maddeleri ile ilgili yapılan diğer çalışmalara baktığımızda ise, Schlatter ve arkadaşları (1992), gıda katkı maddelerinde koruyucu olarak kullanılan sodyum sorbat, potasyum sorbat ve 4,5-epoxy-2-hexenoic acid' in genotoksik etkisini *SMART* yöntemi ile araştırdıklarında sadece 4,5-epoxy-2-hexenoic acid'in zayıf genotoksik etkiye sahip olduğunu, potasyum sorbat ve sodyum sorbat'ın ise genotoksik etki göstermediğini saptamışlardır. Koruyucu katkı maddelerinden birisi olan sülfitletler (SO_2) asırlardır kullanıldığı halde, son 20-25 yılda astımlı olan veya olmayan kişilerde alerjik reaksiyonlara neden olabilirler (Carbaroğlu ve Canbaş 1993). Sülfitletlerle ilgili yapılan çalışmalarda kişilerin ölümüne neden olacak kadar ciddi alerjik reaksiyonlara yol açtıkları saptanmıştır (Jacopsen ve Fritschner 1991, Adams 1992). Dört gıda koruyucusunun (sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrat ve potasyum nitrit) *D. melanogaster*'de somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (*SMART*) ile genotoksisitesinin araştırıldığı bir çalışmada ise, sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrat ve potasyum nitrit 25, 50, 75 ve 100 mM olmak üzere dört farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Kontrol grubu (distile su) ile uygulanan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında mutasyon gözlenen kanat sayısı ile toplam mutasyon arasında pozitif bir ilişki belirlenmiştir (Sarıkaya ve Çakır 2005).

Sasaki ve arkadaşlarının (2002) yapmış olduğu bir çalışmada gıdalardaki birçok boyanın (Amaranth, Allura Red, New Coccine, Tartrazine, Erythrosine, Phloxine ve Rose Bengal) mide, kolon ve/veya mesane de doza bağlı olarak DNA hasarına neden oldukları gösterilmiştir. Kalender (1997), gıdalarda koruyucu amaçla kullanılan sodyum benzoat ve renklendirici amaçla kullanılan tartrazinin fare dermal ve ince barsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranülasyon etkilerini araştırmıştır. Sonuç olarak, sodyum benzoat ve tartrazinin hem dermal bağ dokusu mast hücrelerinde, hem de ince barsak bağ dokusu mast hücrelerinde degranlasyona neden oldukları tespit edilmiştir. Birçok gıda ürününde yapay tatlandırıcı olarak kullanılan sakkarinin ise mesane kanserine neden olabileceği ifade edilmiştir (Ertuğrul 1998, Sasaki vd 2002).

Bu katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tüzük dışı olarak gıdalarda kullanıldığı zaman halk sağlığı açısından zararlı olabilir. Son zamanlarda kimyasal karsinojenlere maruz kalma, önemli bir sorun haline gelmiştir. Katkı maddeleri laboratuvar hayvanlarında yüksek dozda, kansere neden olabilirler ancak uygun miktarlarda kullanıldıklarında emniyetlidirler (Brown 1997).

Ülkemizde 1970’li yıllarda yapılan çalışmalarda et ürünlerinde kullanılan nitrit ve nitratın izin verilenin çok üzerinde kullanıldığı saptanmıştır (Alperden vd 1979, Kuyumcu ve Yurttagül 2000). Renklendiricilerle ilgili yapılan çalışmalarda ise, kullanılan miktarların izin verilenin çok üzerinde olduğu saptanmıştır (Topsoy vd 1991). Renklendiricilerle ilgili yapılan bir başka çalışmada ise, 25 şekerleme örneğinin 11’inde izin verilmeyen renklendiricilere rastlanmıştır (Yentür ve Karakaya 1985). Demirer (1974) ise 201 şekerleme ürününden 25’inin izin verilen renklendiricilerle, 66’sının izin verilen ve verilmeyen renklendiricilerle karışık olarak, 110’unun ise izin verilmeyen renklendiricilerle boyandığını saptamıştır.

Çalışmamızda kullanılan Benzil türevlerinden Benzaldehit, Benzil asetat, Benzil alkol ve Benzoik asit’in, *Drosophila*’nın model organizma olarak kullanıldığı *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile yapılmış bir çalışması olmadığı için bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalara kaynak sağlaması açısından ayrı bir önem taşımaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar,

Benzaldehit, Benzil asetat, Benzil alkol ve Benzoik asit için yapılacak mutasyon testleri için önemli bir kaynak olacaktır. Bununla birlikte bu Benzil türevlerinin daha birçok çalışma ile genotoksikolojik etkilerinin belirlenmesine ihtiyaç vardır.

Gerek dünyada gerekse ülkemizde çok yaygın olarak kullanıldığı bilinen benzil türevlerinin genotoksikolojik etkileri çalışılan teste (*in vitro* ve *in vivo*) ve kullanılan model organizmaya göre değişiklik göstermektedir. Bu çalışmada model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in özel hatlarıyla yapılan *in vivo* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi kullanıldı. Çalışmadan elde edilen bulgular önceki çalışmalardan elde edilen sonuçlara büyük oranda benzerlik göstermektedir. Ayrıca çalışmada kullanılan derişimlerin kapsadığı aralığa bakıldığında 0.1 mM gibi çok düşük bir derişimden 50 mM gibi yüksek bir derişime kadar geniş bir spektrumda değerlendirilmiştir. Çalışılan bu derişimlerin pratikte kullanılan derişimleri de kapsadığı göz önünde bulundurulduğunda sonuçlar daha çarpıcı hale gelmektedir. Diğer taraftan genotoksik etkisinin olumsuz olduğu bilinen benzil türevlerinin kullanımı konusunda ayrı bir dikkat gerekmektedir. Bu tür benzil türevlerinin gerek kullanım miktarı gerekse kullanım şekli ayrıca gözden geçirilmelidir. Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek dozlarda kullanılsalar dahi bu maddelerin ya da detoksifikasyon süreci oluşan aktif metabolitlerinin, bir süre sonra vücutta birikerek insan sağlığını tehdit edebilecek miktarlara ulaşabileceği, dokularda hasar meydana getirebileceği, kısaca insan için mutajenik ve karsinojenik olabileceği gibi konular göz ardı edilmemelidir. Yapılan araştırmalar, dengeli beslenmenin insanların fiziksel ve mental çalışmalarını büyük ölçüde etkilediğini göstermiştir. Bu nedenle gıda katkı maddelerinin (GKM) kullanımları ile ilgili olarak uyulması zorunlu olan bazı temel ilkeler vardır. GKM yasalara uygun şekilde kullanıldığında, yani izin verilen katkı maddesi izin verilen besinlerde ve izin verilen miktarlarda kullanıldığında; yararlandığımız ve sağlık riskleri minimize edilmiş maddelerdir. Uygun GKM kullanımı ile ürün çeşitliliği artacak, besin kayıpları azalacak, fiyatlar düşecek ve beslenme durumu olumlu etkilenecektir. GKM'nin uygun kullanımı üretici, tüketici ve devlet iş birliğini gerektirmektedir. Üreticiler otokontrolle ürettikleri besinin kalitesini, üretim aşamalarında, satışa sunmadan önce, kontrol etmeye önem vermelidir. Bunu kavrayan üreticiler kaliteli ve sağlıklı üretim yaparak hem halk sağlığına hizmet

edecekler, hem de rekabette öncelik kazanacaklardır. Tüketiciler GKM'ler konusunda bilinçlendirilmelidir. Besin sanayisi için tüketici istekleri son derece önemlidir. Bilinçli tüketici, doğru GKM kullanımı konusunda, hem üreticiyi hem de devleti etkin kontrol yapma konusunda daha duyarlı hale getirecektir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada gerek bütün dünyada gerekse ülkemizde en çok kullanılan 4 Benzil türevinin iki gen çifti bakımından trans-heterozigot olan *D. melanogaster* larvalarında mutajenik ve rekombinojenik özellikleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre; Benzil alkol ve Benzaldehit'in kullanılan derişimlerinin hem mutajenik hem de rekombinojenik etki gösterdiği, Benzil asetat ve Benzoik asit'in rekombinasyonu tetiklediği gözlenmiştir.

Bazı tümörlerin indüklenmiş rekombinasyon sonucu tümör baskılayıcı genleri inaktive etmesi veya proto-onkogenleri aktive etmesi nedeniyle kanserin başlamasına neden olduğu göz önüne alındığında bu gibi etkiye sahip benzil türevlerinin toplum sağlığı açısından ne derece önemli olduğu daha çarpıcı olarak görölmektedir. Benzil türevlerinin belirlenmiş uygun dozdan daha fazla miktarda kullanılması gerek doğal dengenin bozulması ve gerekse sağlık açısından; toksik, mutajenik, kanserojenik ve teratojenik etkileri bakımından oldukça önemlidir.

Benzil türevlerinin *D. melanogaster*'de genotoksik özelliklerinin ortaya çıkarılmasıyla ilgili çok sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu çalışmada model organizma olarak kullanılan *D. melanogaster*'in genetik yapı olarak insana büyük oranda benzerlik göstermesi, ökaryotik bir organizma olması ve yapılan çalışmanın da *in vivo* koşullarda yapılmış olması bulgular açısından önemlidir. Bu test yardımı ile ayrılmama (non-disjunction), kromozomdan parça kopması (delesyon), kromozomun bir parçasının yer değiştirmesi (translokasyon) ve rekombinasyon gibi birçok genetik hasar belirlenebilmektedir. Bu çalışmada kullanılan SMART'ın *in vivo* bir test olması nedeniyle herhangi bir Benzil türevine karşı organizma tarafından verilen cevabın böyle bir test ile gösterilmesi daha büyük öneme sahiptir. Bu tür çalışmaların toplum sağlığını doğrudan ilgilendirmesi nedeniyle daha farklı testlerle değerlendirilmesi gereği vardır.

Sonuç olarak, gıdalara lezzet vermek amacıyla kullanılan Benzil türevlerinin insan üzerinde de genotoksik etkisi olabileceği dikkate alınarak toplum sağlığı açısından daha kontrollü olarak kullanılmalıdır. Bu çalışmada kullanılan Benzil türevlerinin

yiyecek ve içeceklerde en çok kullanılan Benzil türevleri olduğu göz önüne alınırsa bu gibi kimyasalların kullanımında bir kontrol mekanizmasının olması gerekliliği vardır. Ayrıca halen kullanılmakta olan Benzil türevleri sürekli olarak daha hassas çalışılmalıdır ve ökaryotik *in vivo* sistemlerle yapılan testlerle elde edilecek sonuçlar göz ardı edilmemelidir. Bu testler sonucunda olumsuz etkisi görülen Benzil türevlerinin üretimi ve kullanımı yasaklanmalıdır. Diğer taraftan halen uygulanmakta olan Benzil türevlerinin uzmanlar kontrolünde ve uygun derişimlerde uygulanması sağlanmalıdır. Bu çalışmadan elde edilen bulguların daha sonra yapılacak olan çalışmalara kaynak teşkil edeceği düşünülmektedir ve elde edilen verilere dayanarak bu katkı maddelerinin fayda/zarar değerlendirmesi mümkün olacaktır.

6. KAYNAKLAR

- ADAMS, E.J. Nutritional Care in Food Allergy and Food İntolerance. MOHAN, L.K., ARLIN, M. (Ed) 1992. : *Food Nutrition and Food Therapy*. WB Sounders Company. Philadelphia.
- ADAMS, T.B., COHEN, S.M., DOULL, J., FERON, V.J., GOODMAN, J.I., MARNETT, L.J., MUNRO, I.C., PORTOGHESE, P.S., SMITH, R.L., WADDELL, W.J. and WAGNER, B.M. 2005. The FEMA GRAS assessment of benzyl derivatives used as flavor ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, 43(8):1207-40.
- ALONSO-MORAGA, A. and GRAF, U. 1989 Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*, 4: 105-110.
- ALPERDEN, İ., KOCAKUŞAK S., KONUKÇU H. ve TÜRKMEN S. 1979. Gıda Maddelerinde Çeşitli Standartlara Göre Müsaade Edilmeyen Katkı Maddelerinin Saptanması.TÜBİTAK Marmara Bilimsel ve Endüstriyel Araştırma Enstitüsü Yayın No: 38.
- ALTUĞ, T. *Hekim ve Yaşam* (Sayı: Haziran 99/ Sy: 29-30-31). Ege Ü. Gıda Müh. F.
- AMARAL, V.S., SILVA, R.M., REGULY, M.L and ANDRADE, H.H.R. 2005. *Drosophila* wing spot test for genotoxic pssessment of Pollutants in water samples from urban and industrial origin. *Mutat. Res.*, 583: 67-74.
- AMARAL, V.S., SILVA, R.M., REGULY, M.L and ANDRADE, H.H.R. 2006. Genetic toxicity in surface water from Guaiba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agricultural sewage in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Pollut.*, 139: 469-476.
- ANDERSON, D. and STYLES, J.A. 1978. The bacterial mutation test. *British Journal of Cancer.*, 37: 924–930.
- ANDERSON, B.E., ZEIGER, E., SHELBY, M.D., RESNICK, M.A., GULATI, D.K., IVETT, J.L. and LOVEDAY, K.S. 1990. Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16 (Supp. 18): 55–137.
- ASHBURNER, A. 1989. *Drosophila: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1331 pp. New York.
- BATISTE-ALENTORN, M., XAMENA, N., CREUS. A. and MARCOS R. 1995. Genotoxicity testing of five compounds in three *Drosophila* short-term somatic assay. *Mutat. Res.*, 341: 161-167.

- BERNARDS, A. and HARIHARAN, I. K. 2001. Of flies and men- studying human disease in *Drosophila*. *Current Opinion in Genetics & Development*. 11:274-278.
- BRIGGS, D.R. 1997. Food Additives. Wahlgvist ML (Ed). Food and Nutrition. Allen&Unwin Pty Ltd. Australia.
- BROWN, J.E. 1997. Nutrition Now. West Publishing. St. Paul.
- BRUSICK, D. 1987. Principles of genetic toxicology. 2nd Edition, Plenum, New York, 284pp.
- BUTCHKO, H.H., STARGEL, W.W. and COMER, C.P. et al. 2002. Aspartame: review of safety. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 35: 1-93.
- CARBAROĞLU, T. ve CANBAŞ, A. 1993. Şarapçılıkta Kükürt Dioksit Kullanımı ve Önemi. *Gıda*. 18 (2): 83.
- CASPARY, W.J., LANGENBACH, R., PENMAN, B.W., CRESPI, C., MYHR, B.C. and MITCHELL, A.D. 1988. The mutagenic activity of selected compounds at the TK locus: rodent vs. human cells. *Mutat. Res.*, 196: 61–81.
- CONSTAIN, J.M. and OWENS, E.T. 1982. Introductions and perspectives of plant genetics and cytogenetic assay. A report of Environmental Production Agency Gene-Tox. Program. *Mutat. Res.*, 99: 1-11.
- COTRUVO, J.A., SIMMON, V.F. and SPANGGORD, R.J. 1977. Investigation of mutagenic effects of products of ozonation reactions in water. *Annals of the New York Academy of Sciences* 298: 124–140.
- CREBELLİ, R., BELLINCAMPI, D., CONTI, G., CONTI, L., MORPURGO, A. and CARERE, A. 1986. Comparative study on selected chemical carcinogens for chromosome malsegregation, mitotic crossing-over and forward mutation induction in *Aspergillus nidulans*. *Mutat. Res.*, 172: 139-149.
- DEMİRER, A. 1974. Şekerdeki Boyaların İnce Tabaka Kromatografisi ile Tanımlanmaları Üzerine Araştırmalar. A.Ü. *Veteriner Fakültesi Dergisi*. 21: 145.
- De SERRES, F.J. and SHELLY, M.D. 1978. Higher plant systems as a monitors of environmental mutagens. *Environ. Health. Perspect.*, 27:1-206.
- EBRINGER, L., SUBİK, J. and LAHITOVA, N. 1982. Mutagenic Effect of Two Nitrofurantoin Food Preservatives, *Neoplasma*., 29 (6): 675-684.

- ERTUĞRUL, N. 1998. Food additives regulations and health problems about upper limit of some food additives, M. S. Thesis, İstanbul University.
- EVANS, H.J. and SCOTT, D. 1964. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by x-rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics.*, 49:17-38.
- FALAKALI, B. 1990. *Drosophila* Genetiği. Ege Üniversitesi Basımevi Basımevi 44 ss., Bornova-İzmir.
- FLORIN, I., RUTBERG, L., CURVALL, M. and ENZELL, C.R. 1980. Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames test. *Toxicology.*, 18: 219-232.
- FLUCK, E.R., POIRIER, L.A. and RUELIUS, H.W. 1976. Evaluation of a DNA polymerase-deficient mutant of *E. coli* for the rapid detection of carcinogens. *Chem. Biol. Interact.*, 15: 219-231.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA), 1975. Mutagenic Evaluation of Compound FDA 73-70, Benzoic acid, Certified A.C.S. Food and Drug Administration (FDA), Litton Bionetics, Inc. Washington, DC.
- FOUREMAN, P., MASON, J.M., VALENCIA, R. and ZIMMERING, S. 1994. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*: X. Results of 70 coded chemicals tested for the National Toxicology Program. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23: 208-227.
- FREI, H., WURGLER, F.E., JUON, H., HALL, C.B. and GRAF, U. 1985. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in *Drosophila* genotoxicity tests. *Arc. Toxicol.*, 56: 158-166.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1988. Statistical methods to decide whether mutagenic test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive results. *Mutat. Res.*, 203: 297-308.
- FREI, H., CLEMENTS, J., HOWE, D. and WURGLER, F.E. 1992. The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 279: 21-33.
- FREI, H. and WURGLER, F.E. 1995. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 334: 247-258.
- FREI, H., and WURGLER, F.E. 1996. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutagenesis*, 11 (4):315-325.

- GALLOWAY, S.M., ARMSTRONG, M.J., REUBEN, C., COLMAN, S., BROWN, B., CANNON, C., BLOOM, A.D., NAKAMURA, F., AHMED, M., DUK, S., RIMPO, J., MARGOLIN, B.H., RESNICK, M.A., ANDERSON, B. and ZEIGER, E. 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid Exchange in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 10 (Supp. 10): 1-35.
- GARCIA, BELLIDO. and MERIAM, J.R. 1971. Parameters of the wings imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.*, 24: 61-87.
- GARCIA-BELLIDO, A. and DAPENA, J. 1974. Induction, detection and characterization of cell differentiation mutations in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.*, 128: 117-130.
- GEBEL, T.W., MULLER, M.M., WESTPHAL, G.A. and HALLIER, E. 2001. Genotoxicity of N-nitrosodicyclohexylamine in V79 cells in the sister chromatid exchange test and the single cell gel assay. *Arch. Toxicol.*, 75 (10): 604-608.
- GONZALES-CESAR, E. and RAMOS-MORALES, P. 1997. Sodium Azide Induces Mitotic Recombination in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 389 (2 3):157-165.
- GOTO, Y., MATSUDA, T., ITO, K., HUH, N., THOMALE, J., RAJEWSKY, M., HAYATSU, H. and NEGISHI, T. 199. Mutagenicities of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in *Drosophila* and their relationship to the levels of O-alkyl adducts in DNA. *Mutat. Res.*, 425: 125-134.
- GRAF, U., WURGLER, F.E., KATZ, A.J., FREI, H., JUAN, H., HALL, C.B. and KALE, P.G. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mutagen.*, 6: 153-188.
- GRAF, U., FREI, H., KAGI, A., KATZ, A.J. and WURGLER, F.E. 1989. Thirty compounds tested in *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, 222: 359-373.
- GRAF, U., HALL, C.B. and VAN SCHAIK, N. 1990. On the use of excision repair of defective cells in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 16: 225-237.
- GRAF, U. and SCHAIK, N.V. 1992. Improved highbioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 271: 59-67.

- GRAF, U., VAN SCHAIK, N., and WURGLER, F.E. 1992. *Drosophila* Genetics "apratrical course" 239 pp., New York.
- GRAF, U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experimentia*, 51: 168–173.
- GUZMAN-RINCON, J. and GRAF, U. 1995. *Drosophila melanogaster* somatic mutation and recombination test as a biomonitor. Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change. Butterworh, F.M. (editor).169–181, New York.
- GÜNEŞLİ, A. 2000. “Bazı Gıda Boyalarının Toksikolojik Etkileri” Seminer, A.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı.
- GÜRCAN, T. 1993. Gıda Maddelerinin Toksikolojik Açıdan değerlendirilmesi. *Gıda Sanayi* 7 (2): 29.
- HAWORTH, S., LAWLOR, T., MORTELMANS, K., SPECK, W. and ZEIGER, E. 1983. Salmonella mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environmental Mutagenesis.*, 5 (Supp. 1): 3–142.
- HAYASHİ, M., KISHI, M., SOFUNİ, T., ISHİDATE Jr.M. 1988. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals. *Food Chem. Toxicol.*, 26: 487-500.
- HECK, J.D., VOLLMUTH, T.A., CİFONE, M.A., JAGANNATH, D.R., MYHR, B. and CURREN, R.D. 1989. An evaluation of food flavoring ingredients in a genetic toxicity screening battery. *Toxicology* 9, 257 (Abstract # 1031).
- IDAOMAR, M., EL HAMSS, R., BAKKALİ, F., MEZZOUG, N., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., MUNOZ-SERRANO, A., LIEMANS, V. and ALONSO-MORAGA, A. 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 513: 61-68.
- ISHIDATE, JR., M., SOFUNI, T., YOSHIKAWA, D., HAYASHI, M., NOHMI, T., SAWADA, M. and MARSOUKA, A. 1984. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food. Chem. Toxicol.*, 22: 623–636.
- ISHIGURO, S., MIYAMOTO, A., OBI, T. and NISHIO, A. 1993. Teratological studies on benzyl acetate in pregnant rats. Bulletin of the Faculty of Agriculture, Kagoshima University 43: 25–31.
- JACOPSEN, M.F. and FRITSCHNER, I. 1991. The Completely Revised and Updated Fast Food Guide. Workman Publishing. New York.

- JANSSON, T., CURVALL, M., HEDIN, A. and ENZELL, C.R. 1988. In vitro studies of the biological effects of cigarette smoke condensate: III. Induction of SCE by some phenolic and related constituents derived from cigarette smoke: a study of structure–activity relationships. *Mutat. Res.*, 206: 17–24.
- KALENDER, S. 1997. Sodyum Benzoat ve Tartrazinin Fare Dermal ve İnce Bağırsak Bağ Dokusu Mast Hücrelerinde Degranülasyon Etkileri, Doktora Tezi, A.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Ankara.
- KASAMAKI, A., TAKAHASHI, H., TSUMURA, N., NIWA, J., FUJITA, T. and URASAWA, S. 1982. Genotoxicity of flavoring agents. *Mutat. Res.*, 105: 387–392.
- KATZ, A.J. and FOLEY, T.A. 1993. Effects of temperatures on frequencies of spots in *Drosophila* wing spot assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 54-58.
- KAYA, B., YANIKOĞLU, A. and MARCOS, R. 1999. Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratogen. Carcinogen. and Mutagen.*, 19: 305-312.
- KAYA, B. 2000. Bazı pestisitlerin *Drosophila melanogaster* hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 134 ss. Antalya.
- KAYA B., KOCAOĞLU S., and DEMİR E. 2006. Analysis of UV-Stimulated Recombination in the *Drosophila* SMART Assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 47(5): 357–361.
- KING, H. and LUNFORD, R. 1950. The relation between the constitution of arsenical and their action on cell division. *J. Chem. Soc.*, 8: 2086-2088.
- KOCAOĞLU, S. 2004. Bazı Antidepressant İlaçların *Drosophila melanogaster*'de Mutajenik ve Rekombinojenik Etkilerinin Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 68 ss. Antalya.
- KOTSONIS, F.N., BURDOCK, G.A. and FLAMM, W.G. 2001. Food toxicology.in “Casarett&Doull’s Toxicology 6th edition” Ed. C.D. Klaassen. Sayfa 1049–1087. McGraw-Hill. New York.
- KUMARI, J. and KRISHNAMURTHY, B. 1986. Mutagenicity studies with saftotin in *Drosophila melanogaster* and mice. *Environ. Res.*, 41: 44-52.
- KURODA, K. YOO, Y.S., and ISHIBASHI, T. 1984b. Antimutagenic activity of food additives. *Mutat. Res.*, 130-369

- KURODA, K., YAMAGUCHI, Y. and ENDO, G. 1992. Mitotic toxicity, sister chromatid exchange and rec assay of pesticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 13-18.
- KUYUMCU, A. ve YURTTAGÜL, M. 2000. Ankara Piyasasında Satılan Salam, Sucuk ve Sosislerin Nem Yağ, Tuz, Kül ve Kalıntı Nitrit-Nitrat Miktarlarının Tayini Üzerine Bir Araştırma. *Beslenme ve Diyet Dergisi*. 29 (2): 14.
- KÜÇÜKUSTA, A.R. 2003. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi, 29 Ekim 2003. (<http://ntvmsnbc.com/news/245728.asp>).
- LEHAMNN, M., FRANCO, A., VILAR, K.S.P., REGULY, M.L and ANDRADE, H.H.R. 2003. Doxorubicin and two of its analogues are preferential inducers of homologous recombination compared with mutational events in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 539: 167-175.
- LEWIS, E.B. and BACHER, F. 1968. Methods of feeding ethylmethanesulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Drosophila. Inf. Serv.*, 43: 193.
- LINDSLEY, D.L. and GRELL, E.H. 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Institution of Washington Publ. 627., 472 pp., Washington DC.
- LINDSLEY, D.L., and ZIMM, G.G. 1992. "The Genome of *Drosophila melanogaster*", Academic Press, 1133 pp. San Diago, CA.
- LONGNECKER, D.S., ROEBUCK, B.D., CURPHEY, T.J. and MACMILLAN, D.L. 1990. Evaluation of promotion of pancreatic carcinogenesis in rats by benzyl acetate. *Food. Chem. Toxicol.*, 28: 665–668.
- LUCAS, C.D., PUTNAM, J.M. and HALLAGAN, J.B. 1999. 1995 Poundage and Technical Effects Update Survey. Flavor and Extract Manufacturers Association (FEMA) of the United States, Washington DC, USA.
- MAARSE, H., VISSCHER, C.A., WILLEMSSENS, L.C. and BOELEN, M.H. 1999. Volatile Components in Food-Qualitative and Quantitative Data. Centraal Instituut Voor Voedingsonderzoek TNO. Zeist, The Netherlands.
- MACIOSZEK, V.K. and KONONOWICZ, A.K. 2004. The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: quinoline yellow and brilliant black BN. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 9 (1): 107–122.
- MAREC, F. and GELBIC, I. 1994. High recombinogenic activities of three antiviral agents, adenin derivatives in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 311: 305–317.

- MARKERT, F. and URSPRUNG, H. 1977. *Entwicklungsbiologische Genetik. Grundranger der modernen Genetik*, Bd. 10. Gustav Fischer Stuttgart.
- MATSOUKA, A., YAMAKAGE, K., KUSAKABE, H., WAKURI, S., ASAKURA, M., NOGUCHI, T., SUGIYAMA, T., SHIMADA, H., NAKAYAMA, S., KASAHARA, Y., TAKAHASHI, Y., MIURA, K.F., HATANAKA, M., ISHIDATE, Jr., M., MORITA, T., WATANABE, K., HARA, M., ODAWARA, K., TANAKA, N., HAYASHI, M. and SOFUNI, T. 1996. Re-evaluation of chromosomal aberration induction on nine mouse lymphoma assay 'unique positive' NTP carcinogens. *Mutat. Res.*, 369: 243-252.
- MATSUI, S., YAMAMOTO, R. and YAMADA, H. 1989. The *Bacillus subtilis*/microsome rec-assay for the detection of DNA damaging substances which may occur in chlorinated and ozonated waters. *Water Science Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research* 21: 857-887.
- McGREGOR, D.B., BROWN, A.G., HOWGATE, S., MCBRIDE, D., RIACH, C. and CASPARY, W.J. 1991. Responses of the L5178Y mouse lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 coded chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 17: 196-219.
- MIRSALIS, J., TYSON, K., BECK, J., LOH, E., STEINMETZ, K., CONTRERAS, C., AUSTERA, L., MARTIN, S. and SPALDING, J. 1983. Induction of unscheduled DNA synthesis (UDS) in hepatocytes following in vitro and in vivo treatment. *Environmental Mutagenesis* 5,482, Abstract # Ef- 5.
- MORTELMANS, K., HAWORTH, S., LAWLOR, T., SPECK, W., TAINER, B. and ZEIGER, E. 1986. Salmonella mutagenicity tests:II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environmental Mutagenesis* 8, 1-119.
- MORTELMANS, K. and ZEIGER, E. 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.*, 455:29-60.
- MUKHERJEE, A. and CHAKRABARTI, J. 1997. In Vivo Cytogenetic Studies on Mice Exposed to Acesulfame-K-a Non-nutritive Sweetener. *Food. Chem. Toxicol.*, 35: 1177-1179.
- MULLER, H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science*, 66: 84-87.
- MUNERATO, M.C., SINIGAGLIA, M., REGULY, M.L and ANDRADE, H.H.R. 2005. Genotoxic effects of eugenol, isoeugenol and safrole in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 582: 87-94.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS) 1970. 1970 poundage and technical effects update of substances added to food. Committee on Food Additives Survey Data, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington, DC.

- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS) 1982. 1982 poundage and technical effects update of substances added to food. Committee on Food Additives Survey Data, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington, DC.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP), 1986. Toxicology and carcinogenesis studies of benzyl acetate in F 344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NTP-TR-250; PB-86-2506. The National Toxicology Program, Research Triangle, NC.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS) 1987. 1987 poundage and technical effects update of substances added to food. Committee on Food Additives Survey Data, Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, Washington, DC
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP), 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of benzyl alcohol in F 344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NTP-TR-343; NIH Publication No. 89-2599. The National Toxicology Program, Research Triangle, NC.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP), 1990a. Toxicology and carcinogenesis studies of benzaldehyde in F 344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NTP-TR-378; NIH Publication No. 90-2833. The National Toxicology Program, Research Triangle, NC.
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP), 1990b. Toxicology and carcinogenesis studies of furfural in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies). NTP-TR-382; NIH Publication No. 90-2837. The National Toxicology Program, Research Triangle, NC
- NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM (NTP), 1993a. Toxicology and carcinogenesis studies of benzyl acetate in F 344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies). NTP-TR-431; NIH Publication No. 92-3162. The National Toxicology Program, Research Triangle, NC.
- NIRAJ, K.T., KALYANI, K.P. and NABI, M.J. (1989). "Genotoxicity of Tartrazine Studied in Two Somatic Assays of *Drosophila melanogaster*". *Mutat. Res.*, 224: 479-483.
- NONAKA, M. 1989. DNA repair tests on food additives. *Environ. Mol. Mutagen.*, 14 (Suppl. 15), 143, Abstract # 414.
- NOHMI, T., MIYATA, R., YOSHIKAWA, K. and ISHIDATE, JR., M. 1985. Mutagenicity tests on organic chemical contaminants in city water and related compounds. I. Bacterial mutagenicity tests. *Eisei Shikenjo Hokoku Bulletin of the National Institute of Hygiene Science* 103: 60-64.

- ODA, Y., HAMANO, Y., INOUE, K., YAMAMOTO, H., NIHARA, T. and KUNITA, N. 1979. Mutagenicity of food flavors in bacteria. Osaka-Furitsu Kosho Eisei Kenkyu Hokoku. Shokuhin Eisei Hen 91-325.
- OHGURO, H., KATSUSHIMA, H., MARUYAMA, I., MAEDA, T., YANAGIHASHI, S., METOKI, T. and NAKAZAWA, M. 2002. A high dietary intake of sodium glutamate as flavoring (Ajinomoto) causes gross changes in retinal morphology and function Experimental Eye Research 75 (3): 307-315.
- OLVERA, O., ARCEO, C. and ZIMMERING, S. 2000. Chlorophyllin (CHLN) and the mutagenicity of monofunctional alkylating agents in *Drosophila*: the action of CHLN need not include an influence on metabolic activation. *Mutat. Res.*, 467: 113-117.
- OSABA, L., AGUIRE, A., ALONSO, A. and GRAF, U. 1999. Genotoxicity testing of six insecticides in two crosses of *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.*, 136: 233-245.
- OSABA, L., REY, M.J., AGUIRRE, A., ALONSO, A. and GRAF, U. 2002. Evaluation of genotoxicity of Captan, Maneb and Zineb in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*: role of nitrosation. *Mutat. Res.*, 518: 95-106.
- PATON, G.R. and ALLISON, A.C. 1972. Chromosomal damage in human cell cultures induced by metal salts. *Mutat. Res.*, 16: 332-336.
- POTTER, C. J., TURENCHALK, G. S. and XU, T. 2000. *Drosophila* in cancer research. TIG., Vol: 16, No :1, 33-39 pp.
- POVOLOTSKAYA, K.L. 1961. On the metabolism of the action of maleic hydrazide in plants. *Bull. Acad. Sci. U.S.S.R. (Russ.) Biol. Ser.*, 2: 250-255.
- PIMENTEL, A.E.P., CRUCES, E. and ZIMMERING, S. 1991 Evaluation of mutagenic potential of tepezcohuite in the *Drosophila* wing spot test. *Mutat. Res.* 264. 115-116.
- PIMENTEL, D., McLAUGHLIN, L., ZEPP, A., LAKITAN, B., KRAUS, T., KLEINMAN, P., VANCINI, F., ROACH, W.J., GRAAP, E., KEETON, W.S. and SELIP, G. 1991. Environmental and economic effects of reducing pesticide use. *BioScience*, 41(6): 402-409.
- RAHDEN-STARON, I. 2002. The inhibitory effect of fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases in vitro and lack of recombinogenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 518: 205-213.
- RAMIREZ, P.V., JUDITH, G.R., ESPINOSA, A. and SUSANA, M.R. 2001. Antimutagenic Effect of One Variety of Green Pepper and Its Possible Interference With The Nitrosation Process, *Mutat. Res.*, 496: 39-45.

- RAPSON, W.H., NAZAR, M.A. and BUTSKY, V.V. 1980. Mutagenicity produced by aqueous chlorination of organic compounds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 24: 590–596.
- RENCUZOĞULLARI, E., TUYLU, B.A., TOPAKTAS, M., İLA, H.B., KAYRALDİZ, A., ARSLAN, M. and DİLER, S.B. 2004. Genotoxicity of aspartame. *Drug. Chem. Toxicol.*, 27 (3): 257-68.
- RENWIEK, A.G. 1995. The Use of an Additional Safety or Uncertainty Factor for Nature of Toxicity in the Estimation of Acceptable Daily İntake and Tolerable Daily İntake Values. *Regulatory Toxicotry and Pharmacology*. 22: 250.
- ROCKWELL, P. and RAW, I. 1979. A mutagenic screening of various herbs, spices and food additives. *Nutrition and Cancer* 1: 10–15.
- RODRİGUEZ-ARNAIZ, R., VOGEL, E.W. and SZAKMARY, A. 1993. Strong intra-sepsific variability in the metabolic conversion of six procarcinogens to somatic cell recombinagensin *Drosophila*. *Mutagenesis*, 8 (6): 543–551.
- ROGAN, E.G., CAVALIERİ, E.L., WALKER, B.A., BALASUBRAMANIAN, R., WISLOCKİ, P.G., ROTH, R.W. and SAUGIER, R.K. 1986. Mutagenicity of benzylic acetate, sulfates, and bromides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem. Biol. Interact.*, 58: 253–275.
- ROSENKRANZ, H.S. and KLOGMAN, G. 1996. Relationship between electronegativity and genotoxicity. *Mutat. Res.*, 328: 215-227.
- ROTHWEL, V. N. 1993. Understanding Genetics, A Molecular Approach. A John Wiley & Sons Inc. Publ. New York. 556 pp.
- RUDD, C.J., MITCHELL, A.D. and SPALDING, J. 1983. L5178Y Mouse lymphoma cell mutagenesis assay of coded chemicals incorporating analyses of the colony size distributions. *Environmental Mutagenesis* 5, 419, Abstract # Cd-19.
- RUIZ, M.J. and MARZIN, D. 1997. Genotoxicity of six pesticides by Salmonella mutagenicity test SOS chromotest. *Mutat. Res.*, 390: 245-255.
- SARIKAYA, R. ve SOLAK, K. 2003. Benzoik Asit'in *Drosophila melanogaster*'de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksisitesinin Araştırılması. GÜ, *Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi*, Cilt 23, Sayı 3: 19–32.
- SARIKAYA, R. and ÇAKIR, Ş. 2005. Genotoxicity testing of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test. *Environ. Toxicol Phar.*, 20: 424-430.
- SASAKI, Y.F., IMANISHI, H., OHTA, T. and SHIRASU, Y. 1989. Modifying effects of components of plant essence on the induction of sister chromatid exchanges in cultured Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 226: 103–110.

- SASAKI, Y.F., KAWAGUCHI, S., KAMAYA, A., OHSHITA, M., KABASAWA, K., IWAMA, K., TANIGUCHI, K. and TSUDA, S. 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environmental Mutagenesis*. 519 (1–2), 103–119.
- SCHAIK, V.N. and GRAF, U. 1991. Genotoxicity evaluation of five tricyclic antidepressants in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 260: 99-104.
- SCHLATTER, J., WURGLER, F.E., KRANZLIN, R., MAIER, P., HOLLINGER, E. and GRAF, U. 1992. "The Potential Genotoxicity of Sorbates: Effects on Cell In Vitro In V79 Cells and Somatic Mutations in *Drosophila*". *Food. Chem. Toxicol.*, 30: 843-851.
- SCHUNK, H.H., SHIBAMOTO, T., TAN, H.K. and WEI, C-I. 1986. Biological and chemical studies on photochemical products obtained from eugenol, benzyl acetate and benzyl benzoate. In: Lawrence, B.M., Mookherjee, B.D., Willis, B.J. (Eds.), *Flavors and Fragrances: A World Perspective*. Proceedings of the 10th International Congress of Essential Oils, Fragrance and Flavors, Washington, DC, USA, 16-29 November, 1986, pp. 1045–1068.
- SELBY, P.B. and OLSON, W.H. 1981. Methods and criteria for deciding whether specific-locus mutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result. *Mutat. Res.*, 203: 297-308.
- SHELBY, M.D., EREXSON, G.L., HOOK, G.J. and TICE, R.R. 1993. Evaluation of a three-exposure mouse bone marrow micronucleus protocol: results with 49 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 21: 160–179.
- SOFUNI, M.D., HAYASHI, M., MATSUKA, A., SAWADA, M., HATANAKA, M. and ISHIDATE Jr., M. 1985. Mutagenicity tests on organic chemical contaminants in city water and related compounds. II. Chromosome aberration tests in cultured mammalian cells. *Eisei Shikenjo Hokoku Bulletin of the National Institute of Hygiene Science* 103, 64–75.
- STEINMETZ, K.L. and MIRSALIS, J.C. 1984. Measurement of DNA repair in primary cultures of rat pancreatic cells following in vivo treatment. *Environmental Mutagenesis*, 6:446.
- STORER, R.D., MCKELVEY, T.M., KRAYNAK, A.R., ELIA, M.C., BARNUM, J.E., HARMON, L.S., NICHOLS, W.W. and DELUCA, J.G. 1996. Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. *Mutat. Res.*, 368: 59–101.
- SZABAD, J., SOOS, I., POLGAR, G. and HEJJA, G. 1983. Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal test. *Mutat. Res.*, 113: 117-133.

- THOMAS, B. 1988. Manual of Dietetic Practice. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- TOPSOY, H., DEMİRER, A. ve BOZKURT, M. 1991. Bazı Şekerli Gıdalara Katılan Sentetik Organik Gıda Boyalarının Miktar Tayini. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 48(1): 21.
- TRIPATY, N.K., PATNAIK, K.K. and MADI, M.D.J. 1991. Acrylamide is genotoxic to the somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 259: 21-27.
- TROCHO, C., PARDO, R. and RAFECAS, I. 1998. Formaldehyde derived from dietary aspartame binds to tissue components in vivo. *Life Sci*. 63: 337-49.
- Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. T.C. Resmi Gazete. Sayı: 23172 16 Kasım 1997.
- VAGLENOV, A.K. and KARADJOV A.G. 1997. Micronucleus frequencies in Bulgarian control populations. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 3 (3): 187-194.
- VAGLENOV, A.K., BLIZNAKOV, V.V. and KARADJOV A.G. 1997a. Cytogenetic monitoring of workers from a nuclear power plan. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 3 (1): 40-47.
- VAGLENOV, A.K., LALTCH, S.G., NOSKO, M.S., PAVLOVA, S.P., PETKOVA, V.V. and KARADIOV, A.D. 1997b. Cytogenetic monitoring of workers exposed to lead. *Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 3 (4): 298-308.
- VAGLENOV, A.K., YANEVA, E.G., LALTCH, S.G., NOSKO, M.S., PETKOVA, V.V., PAVLOVA, S.D., DONEVA, K.V., DEMIROVA, H.I. and KEHAJOV, D.A. 1997c. Antimutagenic prophylaxis of occupational risk group. *Cytogenetic Investigations*, 3 (2): 114-124.
- VALENCIA, R.L., ABRAHAMSON, S., LEE, W.R., VON HALLE, E.S., WOODRUFF, R.C., WÜRGLER, F.E. and ZIMMERING, S. 1984. Chromosomal mutation tests for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 134: 61-88.
- VALENCIA, R., MASON, J.M. and ZIMMERING, S. 1989. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. VI. Interlaboratory comparison of mutagenicity tests after treatment of larvae. *Environ. Mol. Mutagen*. 14: 238-244.

- VAMVAKAS, S., DEKANT, W. and ANDERS, M.W. 1989. Mutagenicity of benzyl S-haloalkyl and S-haloalkenyl sulfides in the Ames test. *Biochemical Pharmacology* 38: 935–939.
- VOGEL, E.W. 1992. Tests for recombinogans in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat. Res.*, 284: 159-175.
- WATERS, R., MİRZAYANS, R., MEREDİTH, J., MALLALAH, G., DANFORD, N. and PARRY, J.M. 1982. Correlations in mammalian cells between types of DNA damage, rates of DNA repair and the biological consequence. Progress in Mutation Research (DNA Repair, Chromosome Alterations Chromatin Structure) 4: 247–259.
- WILLIAMS, G.M., IATROPOULOS, M.J. and WHYSNER, J. 1999. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. *Food. Chem. Toxicol.*, 37: 1027-1038.
- WOODRUFF, R.C., MASON, J.M., VALENCİA, R. and ZİMMERİNG, S. 1985. Chemical mutagenesis testing in *Drosophila*. V. Results of 53 coded compounds tested for the National Toxicology Program. *Environmental Mutagenesis* 7: 677–702.
- WURGLER, F.E. and VOGEL, E.W. 1986. .In vivo mutagenicity testing using somatic cells of *Drosophila melanogaster* in Chemical Mutagens, Principles and Medhods for their detection. Würgler FE and Vogel EW (editors). Vol. 10. Plenum Press, 1-73. pp., New York.
- YENTÜR, G. ve KARAKAYA, A.E. 1985. Kullanımı Yasaklanan Aromatik Azo Yapısındaki Gıda Boyalarının Bazı Gıda Maddelerinde Araştırılması. *Gıda*. 10 (6): 371.
- YENTÜR, G. ve BAYHAN, A. 1990. Bazı Gıda Maddelerinde Sorbik ve Benzoik Asit Miktarlarının Araştırılması. *Gıda*. 15 (2): 79.
- YOO, Y.S. 1986. Mutagenic and antimutagenic activities of flavoring agents used in foodstuffs. *Osaka-Shiritsu Daigaku Igaki Zasshi* 4, 267–288.
- YOSHIKAWA, K. 1996. Anomalous nonidentity between Salmonella genotoxicants and rodent carcinogens: Nongenotoxic carcinogens and genotoxic noncarcinogens. *Environ. Health Persp.*, 104: 40–46.
- YURTTAGÜL, M. 1993. Hızlı Hazır Yemek Fast Food Sisteminde Kullanılan Katkı Maddeleri. AKDAĞ, F., ARSLAN, P. (Ed): Hızlı Hazır Yemek Sistemi (Fast Food). Türkiye Diyetisyenler Derneği yayını: 6, Ankara.

ZEIGER, E., ANDERSON, B., HAWORTH, S., LAWLOR, T. and MORTELMANS, K. 1988. Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.*, 11 (Suppl. 12): 1–158.

ZHONG, B., G. U., W., WHONG, W., WALLACE, W.C. and ONG, T. 1992. Comparative study of micronucleus assay and chromosomal aberration analysis in V79 cells exposed to ethylene oxide. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.*, 11: 227-233.

ZORDAN, M., GRAF, U., SINGER, D., BELTRAME, C., DALLA VALLE, D.L. OSTI, M., COSTA, R. and LEVIS, A.G. 1991. The genotoxicity of nitrotriacetic acid (NTA) in somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 262: 253-261.

ZORDAN, M. OSTI, M. PESCE, M. and COSTA, R. 1994. Chloral hydrate is recombinogenic in the wing spot test in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, 322: 111-116.

<http://www.saglikvakfi.org.tr/html/gkmy.asp?id=58>

<http://users.lmi.net/wilworks/ehn20.htm>

<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/benzaldehyde.htm>

<http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/benzyl%20acetate.htm>

<http://www.chemicaland21.com/industrialchem/solalc/benzyl%20alcohol.htm>

http://www.inchem.org/documents/jecfa/jeceval/jec_194.htm

ÖZGEÇMİŞ

Eşref DEMİR 1982 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya ilinde tamamladı. 2000 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nden 2004 yılında Biyolog unvanı ile mezun oldu. 2005 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.