

T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

II PARABENLERİN ZEA MAYS'TA MEYDANA GETİRDİĞİ
GENOTOKSİK ETKİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

Talal Sahib Makki AL- HAMADANI

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI

ERZİNCAN

2023

Her Hakkı Saklıdır.

Kabul ve Onay Sayfası

Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN danışmanlığında, Talal Sahib Makki AL HAMADANI tarafından hazırlanan bu çalışma .././2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul oybirliği ile kabul edilmiştir.

Başkan:

İmza:

Üye :

İmza:

Üye :

İmza:

Yukarıdaki sonuç Enstitü Yönetim Kurulunun / / 20.... tarih ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bülent ÇAĞLAR

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, şekil ve tabloların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

Bilimsel Etięe Uygunluk Sayfası

“Bazı Parabenlerin *Zea mays*’ ta Meydana Getirdiği Genotoksik Etkinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması” isimli “Yüksek Lisans” tezım tarafımca intihal tespit programı ile incelenmiştir. Buna göre tezimde bilimsel etik ihlali ve intihal olarak nitelendirilebilecek herhangi bir durum olmadığını taahhüt ederim.

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir biçimde elde edildiğini; aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi beyan ederim. 18/01/2023

Talal Sahib Makki AL- HAMADANI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI PARABENLERİN ZEA MAYS'TA MEYDANA GETİRDİĞİ GENOTOKSİK ETKİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Talal Sahib Makki AL- HAMADANI

Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Genetik ve Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Kimyasal maddelerin mutajenik etkileri DNA molekülünü bozarak hücresel problemlere sebep olmaktadır. Parabenler gıda, kozmetik ve ilaç sanayi başta olmak üzere kimyasal endüstride önemli bir yer tutmaktadır. DNA' da meydana gelen genotoksik ve mutajenik etkileri belirlemek amacıyla moleküler markırlar kullanılmaktadır. Çalışmamızda günümüzde sık kullanılan moleküler markır yöntemlerinden olan ISSR ve IRAP tekniği ile etil paraben ve metil parabenin *Zea mays*' da sebep olduğu genotoksik etkinin ve DNA hasarının tespit edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucu kullanılan tüm primerlerde etil ve metil paraben dozlarının artışına bağlı olarak GTS değerini azaldığı, toplam polimorfizm değerinin ise arttığı tespit edilmiştir. Etil ve metil parabenin artan dozlarının DNA'da hasar meydana getirdiği ve genotoksik etki gösterdiği saptanmıştır.

2023 ,42 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Etil Paraben, Genotoxicity, IRAP, ISSR, Metil Paraben, *Zea mays*

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE GENOTOXIC EFFECT CAUSED BY SOME PARABENS IN *ZEAMAYS* BY MOLECULAR METHODS

Talal Sahib Makki AL- HAMADANI

Erzincan Binali Yıldırım University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Genetic and Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

The mutagenic effects of chemical substances cause cellular problems by disrupting the DNA molecule. Parabens have an important place in the chemical industry, especially in the food, cosmetics, and pharmaceutical industries. Molecular markers are used to determine genotoxic and mutagenic effects on DNA. In the current study, it was aimed to determine the genotoxic effect and DNA damage caused by ethylparaben and methyl paraben in *Zea mays* with ISSR and IRAP techniques, which are frequently used molecular marker methods. As a result of the study, it was determined that the GTS value decreased and the total polymorphism value increased due to the increase in ethyl and methylparaben doses in all primers used. It has been determined that DNA damage and genotoxic effect with increasing doses of ethyl and methyl paraben.

2023,42 Pages

Keywords: Ethyl Paraben, Genotoxicity, IRAP, ISSR, Methyl Paraben, *Zea mays*

TEŐEKKÖR

Tez çalışmam boyunca engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, desteğini ve değerli yardımını benden esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOğAN' a teőekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam sırasında değerli vaktini ayırarak destek olan Dr. Öęr. Üyesi Mehmet KUZUCU' ya, aynı laboratuvarı paylaştığımız değerli arkadaşlarım Engin DAę ve Muhammed Semih DARTAR' a değerli yardımları için teőekkürü bir borç bilirim. Hayatım boyunca desteğini esirgemeyen her zaman yardımlarını gördüğüm kıymetli aileme sonsuz sevgi ve teőekkürlerimi sunarım.

Talal Sahib Makki AL- HAMADANI

Ocak, 2023

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
TABLOLAR LİSTESİ.....	vii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. KURAMSAL TEMELLER.....	7
3.1. Mısır Bitkisinin Genel Özellikleri	7
3.2. Parabenler	8
3.2.1 Etil paraben.....	9
3.2.2. Metil parabenin.....	10
3.5. Bitkilerde Stres ve Transposonlar	12
3.6. Moleküler Markörler	13
3.6.1. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	13
3.6.2. Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)	14
3.6.3. Retrotranspozonlar arası çoğaltılmış polimorfizm IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polimorfism).....	15
4. MATERYAL YÖNTEM.....	16
4.1. Materyal.....	16
4.1.1.Bitkisel materyal	16
4.1.2.Kullanılan kimyasal materyaller	16
4.1.3.Kullanılan cihazlar	17
4.1.4.Çalışmada kullanılan çözeltiler	18
4.2. Yöntem	20
4.2.1.Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirme.....	20

4.2.2. DNA izolasyonu	21
4.2.3. DNA saflık tayini	22
4.2.4. IRAP analizi	22
4.2.5. ISSR analizi	24
4.2.6. Elektroforez protokolü	26
4.2.7. Genomik karar sabitliği (GTS) analizi	26
5. SONUÇLAR.....	27
5.1. Sonuçlar.....	27
5.1.1. IRAP analiz sonuçları.....	27
5.1.2. ISSR analiz Sonuçları.....	29
6. TARTIŞMA	31
7. ÖNERİLER.....	34
KAYNAKLAR	35
EKLER.....	41

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Mısır üretimi, ekim alanları ve üretimde önemli ülkeler	7
Şekil 3.2. Etil parabenin kimyasal yapısı	9
Şekil 3.3. Metil parabenin kimyasal yapısı	11
Şekil 3.4. Sınıf I ve Sınıf II retrotransposonlar	13
Şekil 3.5. ISSR yöntemi	14
Şekil 3.6. IRAP yöntemi	15
Şekil 5.1. UV ışığı altında incelenen DNA görüntüleri	27
Şekil 5.2. SUKKULA primeri jel görüntüsü	28
Şekil 5.3. UBC 816 primeri jel görüntüsü	30

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Paraben türleri ve kullanım alanları.....	8
Tablo 3.2. Etil parabenin kimyasal özellikleri	10
Tablo 3.3. Metil parabenin kimyasal özellikleri	11
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	16
Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları.....	17
Tablo 4.3. Etil ve metil paraben uygulanan dozlar	21
Tablo 4.4. IRAP- PCR kullanılan primerler.....	23
Tablo 4.5. IRAP- PCR master mix bileşenleri.....	23
Tablo 4.6. IRAP- PCR protokolü.....	24
Tablo 4.7. ISSR- PCR kullanılan primerler	24
Tablo 4.8. ISSR- PCR master mix bileşenleri	25
Tablo 4.9. IRAP-PCR protokolü.....	26
Tablo 5.1. IRAP analizi GTS ve polimorfizm değerleri	28
Tablo 5.2. ISSR analizi ve polimorfizm değerleri	29

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat Derece
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
g	Gram

Kısaltmalar

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiniükleotitfosfat
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
IRAP	Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR	Inter Simple Sequence Repeats
M	Molar
Mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorid
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
SSR	Basit Dizi Tekrarları
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Trizma Base
UV	Ultraviyole
V	Volt

1.GİRİŞ

Dünya nüfusunun artışına paralel olarak gıda, kozmetik, giyim, temizlik ve ilaç gibi temel tüketim ürünlerine olan talep de günden güne artmaktadır. İhtiyacı gidermek ve talebi karşılamak için bu ürünlerin sadece yeterli miktarda üretimi değil aynı zamanda üretilen ürünlerde kaybı en aza indirip raf ömrünü uzatmak ve kaliteyi artırmaya yönelik yaklaşımlar geliştirmek gerekmektedir. Raf ömrünü uzatmak ürünün erişilebilir olmasının yanında uzun süre aynı kalitede ve insan sağlığına risk oluşturmadan korunmasını sağlamaktadır.

Sanayi devriminden bu yana gelişen endüstri sistemleri büyük miktarda kimyasal üretime fırsat sunmuş ve sürekli artan talep doğrultusunda üretimde kaliteyi ve istenilen düzeyi yakalamak adına kullanılan kimyasallar organizmayı ve çevresini olumsuz etkilemiştir. Kimyasallar yutma, emilim, soluma ve enjeksiyon gibi yollarla vücuda alınarak organizmada toksik, mutajenik, karsinojenik ve teratojenik etkilere varan negatif sonuçlara yol açabilmektedir (Kurt vd., 2018).

Parabenler olarak bilinen sentetik koruyucular, güzellik ürünleri, ilaçlar ve gıda sektörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. 1950'lerden beri çeşitli ürünlerde koruyucu olarak yaygın bir şekilde kullanılan parabenler, ekonomik ve etkili oldukları için cilt bakımı ve kozmetik endüstrileri tarafından kullanılmıştır. Parabenlerin görevi kozmetik, ilaç ve gıda ürünlerinin mikrobiyolojik olarak saflığını korumak, ürünlerin bozulmaya ve mikroplara karşı korunmasını sağlayarak, bileşimlerini veya işlevlerini etkilemeden tüketiciye ulaşmasını sağlamaktır. Parabenlerin kozmetiklerin veya yiyeceklerin kokusu, tadı, yoğunluğu veya diğer özellikleri üzerinde herhangi bir etkisi bulunmadığından yüz kremleri, nemlendiriciler, fondöten, tentürler, balsamlar, ter önleyiciler ve kokularda sıklıkla kullanılmaktadır (FDA, 2022).

35 adet tanımlanmış paraben bulunmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları etil paraben, metil paraben, bütil paraben, propil paraben, izobütil paraben ve izopropil parabendir. Parabenler ayrı ayrı ya da kombine şekilde kullanılmaktadır. Özellikle kozmetik ürünlerinde tek bir üründe 10 farklı parabenin kullanıldığı belirlenmiştir (Fransway vd., 2019).

Parabenlerin kullanımı uzun yıllardır tartışma konusu olmakla beraber meme kanserine yakalanan hastaların hücrelerinde tespit edilmesiyle kullanımı daha da tartışmalı bir hale gelmiştir (Darbre vd., 2004). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda parabenlerin östrojenik etkisi, antiandrojenik etkisi meme ve tümör ilişkisi, erkeklerde kısırlığa ve sperm bozukluklarına sebep olması, adet döngüsü ve tiroit fonksiyonları olmak üzere endokrin bozucu etkisi olduğu rapor edilmiştir. (Darbre vd., 2004; Teresaka vd., 2006; Routledge vd., 1998; Chen vd., 2007; Tavares vd., 2009; Bledzka vd., 2014; Okubo vd., 2001; Darbre vd., 2002; Pugazhendhi vd., 2005; Nishihama vd., 2016; Decker, 2015; Jurewich vd., 2017) Parabenlerin negatif etkileri hakkında literatürdeki çalışmalar hayvansal organizmalarda daha yaygın iken bitkisel organizmalarda genotoksik etkisinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır (Kurt vd., 2018).

Çalışmada günümüzde sık kullanılan moleküler markır metotlarından olan ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) ve IRAP (Retrotranspozonlar Arası Çoğaltılmış Polimorfizm) yöntemi ile metilparaben ve etilparabenin *Zea mays*' da sebep olduğu genotoksik etki ve DNA hasarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Parabenlerin koruyucu maddeler olarak tercih edilmesi ve sıklıkla kullanılan maddeler olmasına sebep olan sayısız özellik, onların önemli ölçüde popüler olmasına katkıda bulunmuştur. Mayalara, küflere ve bakterilere karşı geniş aktivite spektrumu, düşük maliyeti, kimyasal kararlılığı, spesifik bir koku ve tadının olmayışı, ilave edilen ürünlerde kıvam ve renk değişimine sebep olmaması bu özelliklerden bazılarıdır (Błędzka vd., 2014).

Paraben kullanımı 1930 yılında 1 milyon ton/yıl iken bu rakam 2000'li yıllara varıldığında 400 milyon ton/yıl olarak hesaplanmıştır (Altuğ vd. 2000). Parabenler, üründe maya ve küf oluşumunu engellemektedir. Bakterilerden gram (+) olanlara karşı çok etkili iken, gram (-) bakterilere karşı daha az etkilidirler (Itoh vd., 2006). Bugün çok sayıda bakteri, maya ve küf türüne sıklıkla kullanılmalarına karşın parabenlerin bu organizmalar üzerindeki etki mekanizmaları tam manasıyla aydınlatılamamıştır. Fakat genel anlamda mikroorganizma yapılarının zar geçirgenliğini veya mitokondriyal işlevlerini bozmak kaydıyla etkilediği düşünülmektedir (Sox, 1997).

Ticari olarak kullanılan sentetik kökenli parabenlerin dışında bazı organizmaların doğal olarak parabenleri sentezleyebildikleri belirlenmiştir (Peng vd., 2006; Bais vd., 2003).

Parabenlerin popüler kullanıma sahip olması gıda, kozmetik ve farmasötik gibi birçok endüstriyel alanda tercih edilmesi çevreye yani doğal kaynaklara sızmaya sebep olabilir. Akarsulara atık su arıtımı yoluyla daha çok salınımı olsa da dış akış ve atmosferdeki partiküllerin birikimi de kirliliğe etki etmektedir. Yapılan az sayıdaki çalışmada Çin ve Avrupa nehirlerinde paraben miktarları ölçülmüş ve su numunelerinde farklı konsantrasyonlarda paraben tespit edilmiştir. Çin nehirlerinde Avrupa' ya kıyasla daha yüksek konsantrasyonda paraben varlığı olduğu ortaya konmuştur (Peng vd., 2008; Kasprzyk-Hordern vd., 2008; González- Mariño vd., 2009).

Albero vd. (2012); atık su arıtma tesislerinden gelen arıtma çamurunun gübre veya tarımsal toprak ıslahında kullanılması durumunda, çamurda bulunan paraben miktarının insanlar için toksikolojik risk değerlendirmesini yapmış ve paraben miktarının risk oluşturmayacak miktarda olduğunu tespit etmiştir.

Dobbins vd. (2010); suda yaşayan organizmalara karşı paraben toksisitesi araştırmış ve *Pimephales promelas* ve *Daphnia magna* balıklarında standartlaştırılmış akut ve subkronik uç noktalar, yedi farklı paraben (metil-, etil-, izopropil-, propil-, izobütil-, bütil-, benzilparaben) için incelenmiştir. Çalışma sonucunda toplanan verilere göre parabenlere maruz kalan suda yaşayan organizmalar için sınırlı tehlike var gibi görünse de parabenlerin ve metabolitlerinin suda yaşayan organizmalarda östrojenik tepkileri ortaya çıkarma ve kronik toksisiteye sebep olma potansiyeli olduğu tespit edilmiştir.

Dambal vd. (2017) metil paraben'e maruz kalan zebra balığının (*Danio rerio*) embriyo-larva evrelerinde gelişimsel toksisitesini değerlendirdikleri çalışmada, artan konsantrasyonlarda metil parabene maruz bırakılan balıklarda kalp atış hızının, hayatta kalma ve çıkış oranının düştüğü belirlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise perikardiyal ödem kan hücresi birikimi ve eğri omurga gibi kusurların meydana geldiği tespit edilmiştir.

Matthews vd. (1956); fareler üzerinde yaptıkları çalışmada parabenlerin ve bunların sodyum tuzlarının oral LD50 dozlarını tespit etmiş ve farelerde yüksek dozlarda uygulanan parabenler ve sodyum tuzunun, hızlı kas kontrolü kaybına, merkezi sinir sisteminde problemlere ve hızlı ölümlere yol açtığını belirlemiştir.

Bereketoglu ve Pradlan (2019); Zebra balığında metilparaben ve propilparabenin karşılaştırmalı transkripsiyonel analizini yaptığı çalışmada, metilparaben ve propilparabenin, zebra balıklarında gelişimsel problemlere ve ölüme neden olduğunu belirlemiştir. Ayrıca parabenlerin gen ekspresyonunu indükleyerek toksisiteye sebep olduğunu, yağ asidi metabolizması ve endokrin fonksiyonlarını değiştirdiğini tespit etmiştir.

Seven vd. (2017); albino farelerde parabenin sebep olduğu genotoksitenin araştırıldığı çalışmada parabene maruz kalan farelerde canlı ağırlıklarda ve organ ağırlıklarında istatistiksel açıdan önemli bir azalma gözlemlenmiş, mikronükleus (MN) ve kromozomal anormallik sıklığında ise önemli bir artış rapor edilmiştir.

Inai vd. (1985); farelere oral olarak uygulanan bütül ve izobütül p -hidroksibenzoatların tümörjenisitesi araştırılmış ve hematopoietik sistem, akciğer ve yumuşak doku dahil olmak üzere çeşitli bölgelerde tümörler gözlemlenmiştir.

Van Meeuwen vd. (2008); Kozmetikte parabenlerin aromataz önleyici ve kombine östrojenik etkileri ile diğer katkı maddelerinin östrojenik etkilerini MCF-7 hücre proliferasyon deneyinde inceledikleri çalışmada, parabenlerin östrojenik etki gösterdiği bulunmuştur.

Propil parabenin erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerinin incelendiği bir çalışmada, sütten kesildikten sonra erkek sıçanların diyetine parabenlerin eklenmesinin üreme sistemlerinin bozulmasına neden olduğu ve bu bozulmanın gözlemlendiği maruz kalma düzeyi, Avrupa Topluluğu ve Japonya'da parabenlerin kabul edilebilir günlük üst sınır alımı (10 mg/kg vücut ağırlığı/gün) ile aynı olduğu rapor edilmiştir (Oishi, 2002).

Paraben ve türevlerinin insan lenfosit DNA'sı üzerindeki genotoksik etkilerinin RAPD-PCR ve Comet teknikleri ile araştırıldığı çalışmada lenfosit kültürüne uygulanan paraben ve paraben esterlerinin RAPD-PCR tekniğinde polimorfik bantlar meydana getirdiği ve genetik değişikliklerle sebep olduğu, Comet testinde ise doz artışına ve alkil zincir uzunluğuna bağlı olarak kuyruk uzunluğunda artış tespit edilmiştir (Sinan, 2018).

Parabenin mutajenik aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada Mutachromeplate test kiti ile *Salmonella typhimurium* TA 100 ve TA 98 suşları kullanmış ve çalışma sonucunda parabenin negatif etkiler meydana getirdiği rapor edilmiştir (Aydoğan, 2016).

Ayar (2013); çalışmasında *Drosophila melanogaster* ve insan lenfosit hücrelerinde metil paraben, propil paraben, bütül paraben ve etil parabenin genotoksik ve sitotoksik etkisinin belirlenmesini amaçlamıştır. Bu çalışmada *Drosophila* da uygulanan tüm paraben gruplarının yüksek konsantrasyonlar da dahil olmak üzere genotoksik etki göstermediği fakat toksik etki gösterdiği belirlenmiştir. İnsan lenfosit hücrelerinde ise farklı konsantrasyonlardaki (125, 250, 500 ve 1000µg/mL) parabenlerin kardeş kromatit değişimi (KKD) ve MN frekanslarını artırdığı ancak önemsiz olduğu ve bütülparaben ve propilparabenin yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Tayama vd. (2008) Çin hamster yumurtalık hücrelerinde çevresel östrojen benzeri bileşiklerin genotoksik etkilerini inceledikleri çalışmada, parabenin DNA hasarına sebep olduğunu belirlemiştir.

Literatürde parabenlerin negatif etkilerinin araştırıldığı çalışmalar genellikle hayvansal organizmalarla yapılmıştır. Bitkisel organizmalarda parabenlerin genotoksik etkisinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır.

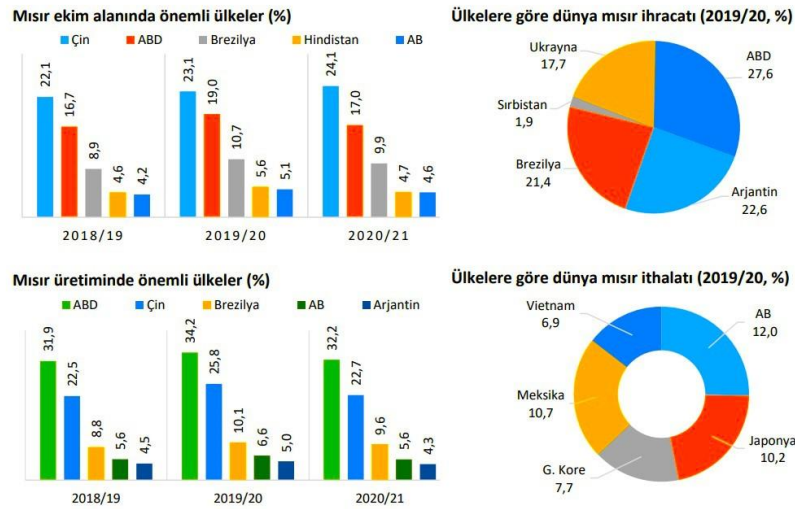
Kurt vd. (2018) paraben' in *Allium cepa L.*'daki anatomik, fizyolojik ve sitogenetik negatif etkiyi araştırdığı çalışmalarında, paraben uygulamasının artan doza bağlı olarak çimlenme ve kök uzunluğunda azalma meydana gelmiş ve kök ucu hücrelerinde MN ve CA sıklığı artmış ve yüksek genotoksik etki gözlenmiştir. Parabenin, fragman, yapışkan kromozom, köprü, eşit olmayan kromatin dağılımı ve düzensiz mitoz gibi kromozom aberasyonlarını artırdığı rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada ise bitki hücrelerinde (*Allium cepa* assay) ve insan lenfositlerinde (kromozom aberasyon testi ve alkalın comet assay) bir dizi test kullanarak metil paraben, etil paraben ve butil parabenin sitogenotoksik etkileri incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlar, metil-, etil- ve butil parabenin belirli bir genotoksik ve sitotoksik potansiyele sahip olduğunu ortaya koymuştur (Todorovac vd. 2021).

3. KURAMSAL TEMELLER

3.1. Mısır Bitkisinin Genel Özellikleri

Mısırın yüzlerce yıllık tarihi Orta Amerika'nın And Dağları bölgesine dayanmaktadır. İnsan ve hayvan tüketimi için önemli bir tahıldır. $2n=20$ kromozomlu diploid bir tek çenekli bitki olan mısır buğdaygiller (*Poacea*) familyasına aittir (Yorgancılar vd., 2019). Karbonhidratça zengin olan mısır aynı zamanda protein, yağ, yüksek oranda mineral ve vitamin içermektedir. Un, nişasta, yağ ve tatlandırıcı olarak kullanımının dışında bitkinin diğer kısımları da ekonomik değere sahiptir (Rose vd., 2010; FAO, 2022).

Küresel mısır üretimi 2020- 2021 yılları arasında 1,1 milyar tondur. Mısır üretiminde ilk sırada yer alan ABD en büyük ihracat hacmine sahiptir. En fazla ithalat yaparak ilk sırada yer alan Çin, en fazla ekili alana sahip ülke olarak ilk sırada yer almaktadır. Türkiye' de mısır üretimi 6,75 milyon tona ulaşarak rekor tazelemiştir (TEPGE, 2022). Mısır üretiminde önemli ülkeler, ekim alanları, ithalat ve ihracat oranları Şekil 3.1' de verilmiştir (Agro Medya, 2021).



Şekil 3.1. Mısır üretimi ekim alanları ve üretimde önemli ülkeler

3.2. Parabenler

Parabenler, p- hidroksibenzoik asidin alifatik esterleridir. Genellikle ilaç, gıda ve kozmetik endüstrisinde koruyucu madde olarak kullanılan kimyasallardır. Parabenler tatsız ve kokusuz olması, antimikrobiyal etkisi, geniş bir pH aralığında kullanılabilir olması ve kimyasal kararlılığı gibi özellikleriyle ön plana çıkmış ve onları çok tercih edilir bir hale getirmiştir. En çok kullanılan paraben çeşitleri metil-, etil- ve propil- başta olmak üzere Tablo 3.1’de verilmiştir (Sheskey vd., 2017).

Tablo 3.1. Paraben türleri ve kullanım alanları

Türü	Kullanım Alanları
Metil paraben	Kozmetik, Gıda, Farmasötik
Etil paraben	Gıda Katkı Maddesi, Kozmetik
Propil paraben	Kozmetik, Temizlik Ürünleri
Bütil paraben	Kozmetik
İsobütil paraben	Kozmetik
Benzil paraben	Kozmetik

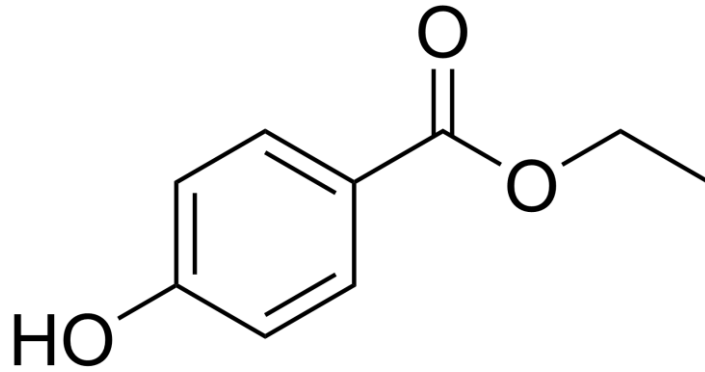
Parabenler gıda endüstrisinde konserve, jöle, unlu mamuller, kremler ve macunlar, soslar ve dolgular, kahveler, turşular, katı ve sıvı yağlar, işlenmiş sebze ve meyveler, alkolsüz içecekler ve dondurulmuş süt ürünleri dahil olmak üzere birçok gıda ürününde kullanılmaktadır (Daniel, 1986; Soni vd., 2005).

Parabenler spesifik koku ve tada sahip olmadıkları için kozmetik endüstrisinde sıklıkla kullanılan koruyucu antimikrobiyal ajanlardır. Yüksek sıcaklıktaki stabiliteleri nedeniyle tek veya kombinasyon halinde birçok ürün içeriğinde kullanılmaktadır. Parabenler şampuan, saç kremi, nemlendirici krem, tonik, deodorant, parfüm, tıraş jeli, bronzlaşma kremi, makyaj malzemeleri, güneş koruyucusu ve diş macunu gibi ürünlerde bulunmaktadır (Maddox, 1982).

Parabenler 1900’lü yıllarda farmasötiklerde ilk defa kullanılmıştır. Parabenler arasında propil paraben, farmasötik preparatlarda kullanılan en etkili fungistatlardan biridir. Haplar, şuruplar, enjeksiyonluk ilaçlar ve merhemler gibi çeşitli ilaçlarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Parabenler günümüzde de sıklıkla kullanılan ve tercih edilen koruyucular olarak rol oynamaya devam etmektedir (Boehm ve Maddox, 1982; Soni vd., 2005).

3.2.1 Etil Paraben

Etilparaben, 4-hidroksibenzoik asidin karboksi grubunun etanol ile bir araya gelmesiyle oluşan bir etil esterdir. Etil paraben antimikrobiyal gıda koruyucusu aynı zamanda antifungal ajan olma özelliği taşımaktadır. Bununla birlikte etil paraben bir bitki metabolitidir ve fitoöstrojen rolü vardır. Farmasötikler, yapıştırıcılar ve çeşitli kozmetik ürünleri ve gıdalarda koruyucu olarak kullanılmaktadır. Etil parabenin kimyasal yapısı Şekil 3.2’ de verilmiştir (ChemBook,2022).



Şekil 3.2. Etil parabenin kimyasal yapısı

Etil parabenin, ortak adı Ethyl 4- Hydroxybenzoate'dır. Moleküler formülü $C_9H_{10}O_3$ ' tür. Erime noktası $115 - 118 ^\circ C$, kaynama noktası $298 ^\circ C$ ' dir. Etil parabenin bazı kimyasal özellikleri Tablo 3.2.'te verilmiştir (PubChem, 2022).

Tablo 3.2. Etil Parabenin kimyasal özellikleri

Fiziksel Yapı	Kristal	Erime noktası	$115 - 18 ^\circ C$
Kimyasal Formül	$C_9H_{10}O_3$	Kaynama Noktası	$298 ^\circ C$
CAS Numarası	120-47-8		
EC Numarası	204-399-4		
Moleküler Ağırlığı	166,17		

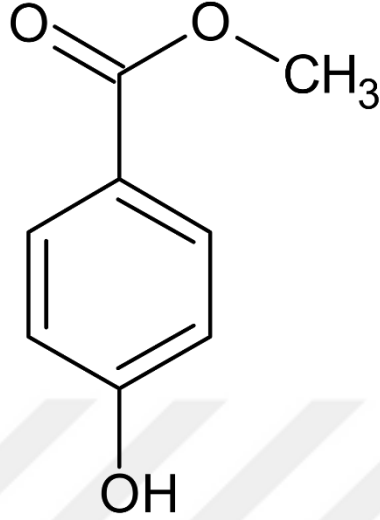
3.2.2. Metil Parabenin

Metilparaben, 4-hidroksibenzoik asidin karboksi grubunun metanol ile formal olarak bir araya gelmesiyle oluşan bir 4-hidroksibenzoat esterdir. Kozmetikte en sık kullanılan antimikrobiyal koruyucudur. Başta yaban mersini olmak üzere birçok meyvede doğal olarak bulunmaktadır. Metil paraben aynı zamanda bir bitki metabolitidir. Antimikrobiyal gıda koruyucusu olarak da kullanılan metil paraben, nöroprotektif ajan ve antifungal ajan olarak da rol oynamaktadır (Ali vd., 1998).

Metil paraben gıda katkı maddesi, farmasötikler, zirai ilaçlar, boya, kişisel bakım ürünleri, temizlik maddeleri, oyuncaklar ve kozmetik ürünleri gibi geniş bir kullanım alanına sahiptir. Metil parabenin gıda endüstrisindeki başlıca kullanım alanları turtalar, kekler, krakerler gibi hamur işleri, kremler, soslar, dolgular, reçeller ve jölelerde de koruyucu madde olarak kullanılmaktadır (Soni vd., 2005).

Metil paraben vücutta birikmez, bir kısmı idrar yoluyla dışarı atılırken, bir kısmı karaciğer ve böbrekte normal yollarla metabolize edilir. Metil paraben, p- hidroksibenzoik asit ve p- hidroksibenzoik asidin glisin, glukuronik asit ve sülfirik asit konjugatları olarak metabolize edilmektedir (Tsukamoto ve Terada, 1964).

Metil parabenin kimyasal yapısı Şekil 3.3'te verilmiştir (NCBI, 2022).



Şekil 3.3. Metil parabenin kimyasal yapısı

Metil Parabenin bazı kimyasal özellikleri Tablo 3.3.'te verilmiştir (NCBI, 2022).

Tablo 3.3. Metil parabenin kimyasal özellikleri

Fiziksel özellik: Kristal toz

Formül: C₈H₈O₃

IUPAC numarası: Metil 4- hidroksibenzoat

Molar kütle: 152,15 g/mol

Erime noktası: 125,2 °C

Kaynama noktası: 270,5 °C

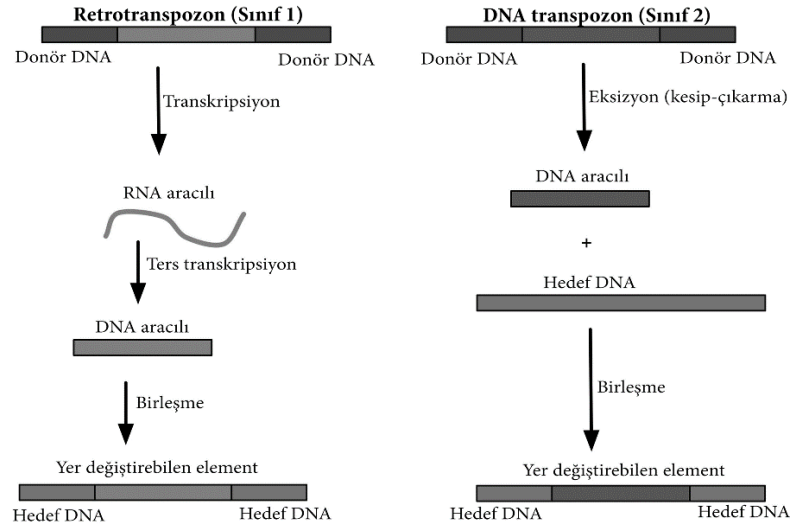
3.5. Bitkilerde Stres ve Transposonlar

Bitkiler yaşamını devam ettirebilmek için dışarıdan gelen tüm çevresel etmenlere uygun cevaplar vermek zorundadır. Bitkilerin çevreden gelen uygun etkiler dışında kalan, bitkinin metabolizmasını negatif etkileyen ve işlev bozukluklarına neden olabilen her durum stres olarak tanımlanmaktadır. Biyotik ve abiyotik etkilere maruz kalan bitkilerde reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan moleküllerin aşırı üretimi ve biriktirilmesiyle oksidatif stres adı verilen bir tepki meydana gelir (Demidchik, 2015).

Transposonlar yeni kromozomal konumlara girebilen ve kendilerinin kopyalarını oluşturabilen DNA parçalarıdır. İlk olarak McClintock tarafından mısır bitkisinde keşfedilen transposonlar hemen hemen tüm genomlarda bulunmaktadır (McClintock 1950). Bitkilerde transposable elementler (TE'ler) genomun yarısından fazlasına denk gelebilmektedir. Transposable elementlerin bir diğer adı sıçrayan genler veya mobil genetik elementlerdir. TE' ler kromozom değişiklikleri, ekspresyonun ve genlerin düzenlenmesi gibi üstlendiği görevlerle genomun evrimleşmesinde ve bitki sistemlerinde çok önemli rol oynamaktadır.

Kromozom değişikliklerine neden olmak, ekspresyonun ve genlerin düzenlenmesi gibi farklı görevler üstlenebilir. Mitokondrideki meydana gelen polimorfizmler, kromozom-Y polimorfizmleri ile evrimsel süreçte yeni belirteçler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bitkilerde transposable elementler türe göre farklılık gösterir ve bitkide en düzensiz bileşenler olarak adlandırılır. Transposable elementler en çok tekrarlanan bölgelerdir. Mutasyonlar meydana getirebilir, genomda yer değiştirebilir ve kendilerini kopyalayarak çoğaltabilirler. Bitkilerde retrotransposonlar stres koşullarında aktif hale gelerek bitkiyi koşullara adapte ederler. RNA molekülü aracılığıyla yer değiştiren Transposable Elementler Sınıf I olarak adlandırılırken, DNA molekülü aracılığıyla yer değiştiren transposonlar Sınıf II olarak adlandırılmaktadır. Sınıf I ve sınıf II transposonlar Şekil 3.4.'te verilmiştir (Agren ve Clark, 2018).



Şekil 3.4. Sınıf I ve Sınıf II retrotransposonlar

3.6. Moleküler Markörler

Moleküler belirteçler, genotipler arasında ayırma yapma yeteneklerinden dolayı genetik temelli araştırma alanlarında oldukça değerlidir. İyi bir markörün yerine getirmesi gereken özellikler, büyük ölçüde bitki popülasyonunun boyutuna ve bileşimine, popülasyonda ayrılan genlerin sayısına bağlıdır. Bununla birlikte, her durumda, tüm moleküler belirteç analiz teknikleri belli kriterlere sahip olmalıdır. Moleküler belirteçler araştırılan bir lokusa çok yakın olmalıdır. Sonuçlar, bir lokusta veya intragenik durumdaysa, birkaç işaretleyici kullanılarak iyileştirilir bu da sonucu daha güvenilir bir hale getirir. Moleküler marker sistemleri yüksek derecede polimorfiktir, farklı genotipler arasında ayırım yapar ve genomda eşit olarak dağılır. Basit, ucuz ve hızlı bir teknik olması ve analizi gerçekleştirmek için çok az genetik başlangıç materyaline ihtiyaç duyulması moleküler belirteçler için öncelikli kriterlerdir (Grover ve Sharma, 2016).

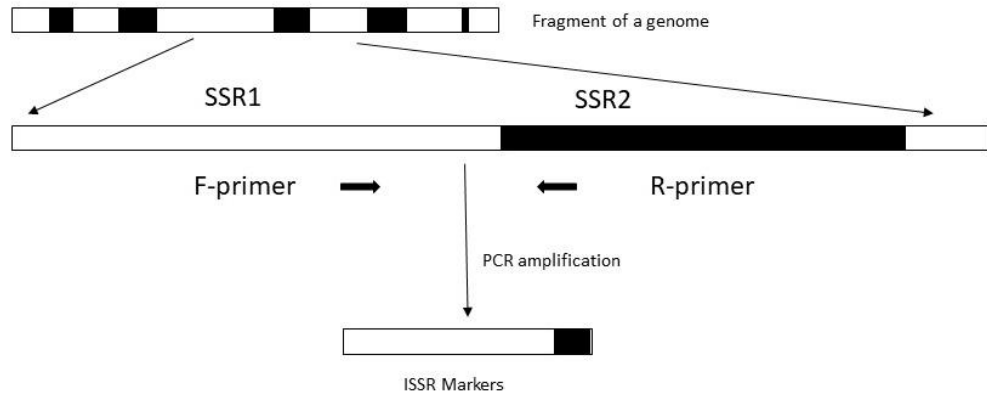
3.6.1. Restriksiyon parçası uzunluk polimorfizmi RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

DNA markör teknolojisi, insan genomunun ilk moleküler haritasının inşası için RFLP markörlerinin geliştirilmesiyle başlamıştır. RFLP, çeşitli kaynaklardan genomik DNA'nın restriksiyon enzimiyle kesiminden sonra farklı uzunluklardaki DNA

fragmanlarının oluşumunu tespit etme prensibine dayanır. Agaroz jel elektroforezinden ve Southern blotlamadan sonra, fragmanlar kısa, tek kopya genomik veya cDNA radyoaktif olarak etiketlenmiş problara hibridize edilir ve otoradyografi ile görüntülenir. RFLP tekniğinin yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, yakın türlerin aynı alellere sahip olması, radyoaktif ve boyama tekniklerinin çok fazla zaman alması ve zahmetli olması onu daha az tercih edilir bir marker yapmıştır (Gebhard vd., 1989).

3.6.2. Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat)

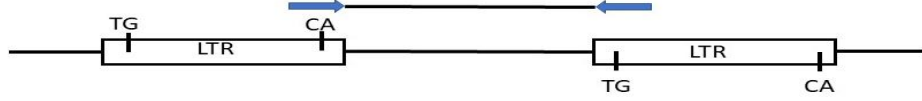
Bu tekniğin temel prensibi uygun ISSR primerlerinin SSR'lere bağlanması ve iki mikrosatelit arasında ISSR amplikonlarının klonlanması ve dizilenmesidir. Primerler için hedef dizi bilgisi gerektirmez ve düşük miktarda DNA'yla uygulanabilir bir marker sistemidir. ISSR yöntemi Şekil 3.5'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Ziętkiewicz vd. 1994).



Şekil 3.5. ISSR yöntemi

3.6.3. Retrotranspozonlar arası çoğaltılmış polimorfizm IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polimorfism)

Retro elementler arasında kalan bölgenin çoğaltılıp sonrasında bu kısma retrotransposon eklenmesi ile polimorfizmin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. IRAP moleküler yönteminde, istenilen uzun terminal tekrarlar (LTR) dizisine bağlanmak üzere kullanılan primerlerin (sol ve sağ) bu iki kısım arasındaki fragmentlerin polimeraz zincir reaksiyonu ile tamamlanması ve izole edilmesi esas alınmıştır. IRAP Şekil 3.6.'da ayrıntılı olarak verilmiştir (Roy vd., 2015).



Şekil 3.6. IRAP yöntemi

4. MATERİYAL YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Bitkisel materyal

Kullanılan *Zea mays* tohumları Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi'nden temin edilmiştir.

4.1.2. Kullanılan kimyasal materyaller

Tablo 4.1.' de çalışmada kullanılan kimyasal materyaller verilmiştir.

Tablo 4.1. Kullanılan kimyasal materyaller

Sıvı Azot	Sterilizasyon ve Öğütme
Sodyum hipoklorit	NaOCl
Taq DNA polimeraz	
dNTP (Deoxynucleotide mix)	
10 X Buffer without MgCl ₂	ISSR ve IRAP Analizleri
MgCl ₂	
Ultra saf su	
Primer	
1 KB DNA Ladder	
Jel Yükleme Solüsyonu	
Ethidium Bromide	Ultraviyole Görüntüleme
Agaroz	
Tris/ Borat / EDTA (TBE)	

4.1.3. Kullanılan cihazlar

Tablo 4.2.' de kullanılan cihazlar ve markaları verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Cihaz adı	Marka
Mikrodalga fırın	Arzum
Magnetik karıştırıcı	Heidolph MR Hei-Standart
Güç kaynağı	Thermo EC 300 XL
Hassas terazi	Shimadzu ATX 120
Buzdolabı	Bosch
PCR cihazı	Bio-Rad C1000 Touch
Vorteks	Heidolph Reaxtop
Saf su cihazı	Nüve
Jel görüntüleme cihazı	Vilber Lourmat Quantum ST5
Spektrofotometre	Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis
Ultra-low dondurucu (-85 °C)	Haier, New Brunswick U410
Otomatik pipetler	Eppendorf Research Plus
Buzdolabı	Arçelik
Derin dondurucu (-30 °C)	Haier
Elektroforez tankı	Thermo Owl Easycast B2-BP
Soğutmalı santrifüj	Hanil Smart R17

4.1.4. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Çalışmada kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

Ekstraksiyon çözeltisi

0,5 M EDTA

Toplam hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

-136,1 g EDTA

-20 g NaOH

1 M Tris-HCl

-42 ml konsantre HCl (%37,2-12,1 M)

-121,1 g Tris base

-700 ml distile su ile toplam hacim 1000ml'ye tamamlanmıştır.

5 M NaCl

-146,1 g NaCl

Toplam hacim distile su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

1 x TE Buffer

-100 ml 10 x TE tamponu

-900 ml saf su ilave edilerek hazırlanmıştır.

Kloroform: İzooamil Alkol

-24 ml kloroform

-1 ml izoamil alkol eklenerek toplam hacim 25 ml olacak şekilde katları hazırlanmıştır.

10 x TE Buffer

-100 ml 10 M Tris-HCl pH 8

-20 ml 0,5 M EDTA

880 ml ultra saf su ile toplam hacim 1000 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

3 M Sodyum asetat

-40,8 g Sodyum asetat

-pH 5,2 olacak şekilde asetik asit eklenmiş

Toplam hacim 100 ml'ye ultra saf su ile tamamlanmıştır.

10 M Amonyum asetat

-7,7 g Amonyum Asetat

Toplam hacim 100 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır.

2- Propanol (İzopropanol)

-Hazır olarak kullanılmıştır.

Proteinaz K

-Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır.

Ribonüklez (Rnaz)

-Mililitrede 10 mg olacak şekilde hazırlanmıştır.

10 X TBE Tamponu

-108 g Tris-base

-55 g Borik asit

-40 ml 0,5 M EDTA

-700 ml dH₂O

Toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanmıştır.

1 X Tbe Tamponu

100ml 10X TBE tamponuna 900 ml saf su eklenerek hazırlanır.

DNA Ekstraksiyon Tamponu (50 Örnek İçin):

14 ml NaCl (5 M)

1 gr toz CTAB (setil trimetil amonyum bromür)

2 ml EDTA (0,5 M)

0,5 gr (%0,1) Sodyum bisüfit Na₂S₂O₅

5 ml Tris-HCl (1 M)

100 µl β-Mercaptoethanol

Toplam hacim saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.

Primerlerin Hazırlanması

Liyofilize halde gelen primerler firmanın önerdiği protokole uygun olarak 1xTE ile sulandırılarak uygun hale getirilmiştir. Çalışmada kullanılacak primerler 10 µl diyolifize primere 40 µl TE eklenerek hazırlanmış ve kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. Tohumların sterilizasyonu ve çimlendirme

Büyüklikleri benzer olan *Zea mays* tohumları alınarak %5' lik NaOCl (sodyum hipoklorit) karışımında 12 dk. tutulmuştur. Ardından tohumlar distile suyla iyice yıkanarak petrilere çimlendirilmek üzere kurutulmuş ve muhafaza edilmiştir. Petrilere çimlendirme için kurutma kağıtları kaplara uygun bir büyüklükte kesilerek

yerleştirilmiştir. Etil ve metil paraben uygulaması için stok solüsyonlar dimetilsülfoksit ile hazırlanarak oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Mısır tohumları etil ve metil parabenin farklı dozları (100 mM, 250 Mm, 500 Mm) ile muamele edilerek petrilere yerleştirilmiş ve 25 °C’ de çimlendirilmeye bırakılmıştır. Moleküler incelemeler için yeterli gelişimi sağlayan bitkiler toplanarak -80 °C’ de muhafaza edilmiştir. Etil ve metil paraben uygulanan gruplar Tablo 4.3’ te verilmiştir.

Tablo 4.3. Etil ve metil paraben uygulanan dozlar

Saksı	Grup	Etil Paraben	Metil Paraben
1	Kontrol	-	-
2	EP1	100 mM	-
3	EP2	250 mM	-
4	EP3	500 mM	-
5	MP1	-	100 mM
6	MP2	-	250 mM
7	MP3	-	500 mM

4.2.2. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu Yağcı (2015) protokolüne göre optimize edilerek aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

-Hazırlanan DNA ekstraksiyon tamponu 65°C’ de ısıtılmış su banyosunda bekletilmiştir.

-Ekstraksiyon tamponuna 100 µl Beta merkaptotanol ilave edilmiştir.

-2 ml’lik bir test tüpüne sıvı azotta öğütülmüş 0,3 gr bitki materyali eklenerek üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon çözeltisi ilave edilmiştir.

-65°C’ ye ısıtılmış sıcak su banyosunda yaklaşık 60 dk. belirli aralıklarla alt üst edilerek bekletilmiştir.

-Her numuneye 750 µl kloroform-izoamil alkol ekleyerek 4 °C' de 20 dk. boyunca 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernatant pipet yardımıyla temiz tüplere alınmıştır.

-Elde edilen süpernatant miktarı kadar kloroform-izoamil alkol eklenmiştir.

-4 °C'de 20 dk. boyunca 14.000 rpm' de santrifüj yapılmıştır.

-Oluşan üst faz ependorf tüplerine alınarak üzerine 100 µl 3 M sodyum asetat, 100 µl 10 M amonyum asetat, 800 µl soğuk izopropanol ilave edilmiştir.

-14000 g ve 4°C'de 20 dk. santrifüj yapıp üst faz uzaklaştırılmıştır.

-Oluşan pellet öncelikle %100 'lük soğuk etanol ile yıkanmıştır.

- Daha sonra %70'lik soğuk etanol ile yıkama işlemi yapılmıştır.

-Meydana gelen peletin kuruması için 37°C'de 15 dk. süre ile bekletilmiştir.

-100 µl TE tamponu içinde elde edilen DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır.

4.2.3. DNA saflık tayini

Epoch Mikroplate Spektrofotometre cihazı kullanılarak DNA örneklerinin saflık tayini gerçekleştirilmiştir. 2 µl DNA örneği, Take 3 mikroplate plakasına yüklenerek Gen 5 yazılımı ile analiz edilmiştir.

4.2.4. IRAP analizi

Mısır bitkisinde etil ve metil parabenin sebep olduğu değişiklikleri incelemek için IRAP yöntemi kullanılmıştır. PCR reaksiyonları Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.4' te IRAP moleküler analizinde kullanılan primer isimleri, baz dizisi ve Tm sıcaklıkları verilmiştir.

Tablo 4.4. IRAP moleküler analizinde kullanılan primerler

Adı	Baz dizisi 5'- 3'	Tm (°C)
NIKITA	ACCCCTCTAGGCGACATCC	58,7°C
3LTR5	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA	64,6°C
5LTR1	TTGCCTCTAGGGCATATTTTCCAACA	58,4°C
SIRE1	GCAGTTATGCAAGTGGGATCAGC	51 °C
SUKKULA	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	63,3°C

Y: Primidin

IRAP- PCR analizi Bulut ve arkadaşlarının (2018) protokolünde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. IRAP- PCR analizinde kullanılan master karışımı içeriği Tablo 4.5.' de verilmiştir.

Tablo 4.5. IRAP analizi master karışım içeriği

Karışım İçeriği	Miktar (µl)
PCR buffer (10x)	2
Deoxynucleotide mix (dNTP)	0,3
Magnezyum Klorür (25 mM)	1,15
Primer- IRAP (5 mM)	1
Taq DNA polimeraz	0,5
Ultra saf su	14,05
Genomik DNA	1
Toplam Hacim	20

IRAP moleküler analizinde uygulanan protokol Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. IRAP analizi protokolü

PCR Aşamaları	Sıcaklıklar	Süreler	Döngüler
Başlangıç	95 °C	2 dk.	1x
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	2x
Primer Bağlanma	* °C	1 dk.	1x
Uzama	72 °C	2 dk.	1x
Denatürasyon	95 °C	30 sn.	41x
Primer Bağlanma	35 °C	1 dk.	1x
Uzama	72 °C	2 dk.	1x
Son Uzama	72 °C	5 dk.	1x
Bekleme	4 °C	∞	1x

4.2.5. ISSR analizi

Mısır bitkisinde etil ve metil parabenin sebep olduğu değişiklikleri incelemek için ISSR yöntemi kullanılmıştır. Tablo 4.7’ de ISSR moleküler analizinde kullanılan primer isimleri, baz dizisi ve Tm sıcaklıkları verilmiştir.

Tablo 4.7. ISSR-PCR analizinde kullanılan primerler

Adı	Bazların Dizilimi 5’- 3’	Tm (°C)
UBC848	CACACACACACACAAG	54
UBC818	CACACACACACACAG	53
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50
UBC816	CACACACACACACAT	50
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGG	53°
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54°
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGACT	54°
UBC856	ACACACACACACACYA	54°
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	56°
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	56°

ISSR- PCR analizi Bulut ve arkadaşlarının (2018) protokolünde küçük değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. ISSR analizinde kullanılan master mix içeriği Tablo 4.8.' de verilmiştir.

Tablo 4.8. ISSR anlizi master mix içeriği

Karışım içeriği	Miktar (µl)
Magnezyum Klorür (25 mM)	1,15
Deoxynucleotide mix (dNTP)	0,3
PCR buffer (10x)	2
Primer- IRAP (5 mM)	1
Taq DNA polimeraz	0,5
Ultra saf su	14,05

ISSR moleküler analizinde uygulanan protokol Tablo 4.9'da verilmiştir.

Tablo 4.9. ISSR analizi protokolü

Aşamaları	Sıcaklıklar	Süreler	Döngüler
Başlangıç	94 °C	4 dk.	1x
Denatürasyon	94 °C	40 sn.	1x
Primer Bağlanma	* °C	40 sn.	1x
Uzama	72 °C	2 dk.	1x
Denatürasyon	94 °C	40 sn.	34x
Primer Bağlanma	* °C	40 dk.	1x
Uzama	72 °C	2 dk.	1x
Son Uzama	72 °C	6 dk.	1x
Bekleme	4°C	∞	1x

4.2.6. Elektroforez protokolü

PCR sonucu elde edilen ürünlerin görüntülenmesi amacıyla agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Agaroz jelinin yoğunluğu %1,5 olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu işlem için 2 g agarozun üzerine 13 ml 10X TBE ve 117 ml saf su ilave edilerek 3 dk. mikrodalga fırında kaynamadan çözünmesi sağlanmıştır. Yaklaşık 55°C'ye kadar soğutulmuş ve 8 µl etidyum bromür ilave edilmiştir.

Elektroforez tankına kullanacağımız taraklar yerleştirilerek jel dökümü yapılmıştır. Jelin katı hale gelmesi için yaklaşık 30 dk. bekledikten sonra taraklar dikkatlice çıkarılmıştır. İlk kuyucuğa marker olacak şekilde diğer kuyucuklara 5 µl PCR ürünü ve 1 µl gel loading solüsyon karıştırılarak kuyucuklara yükleme yapılmıştır. Yüklemenin ardından tank yürütme tamponu ile doldurulmuştur. PCR ürünleri 100 dk. 90 voltta yürütülerek görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

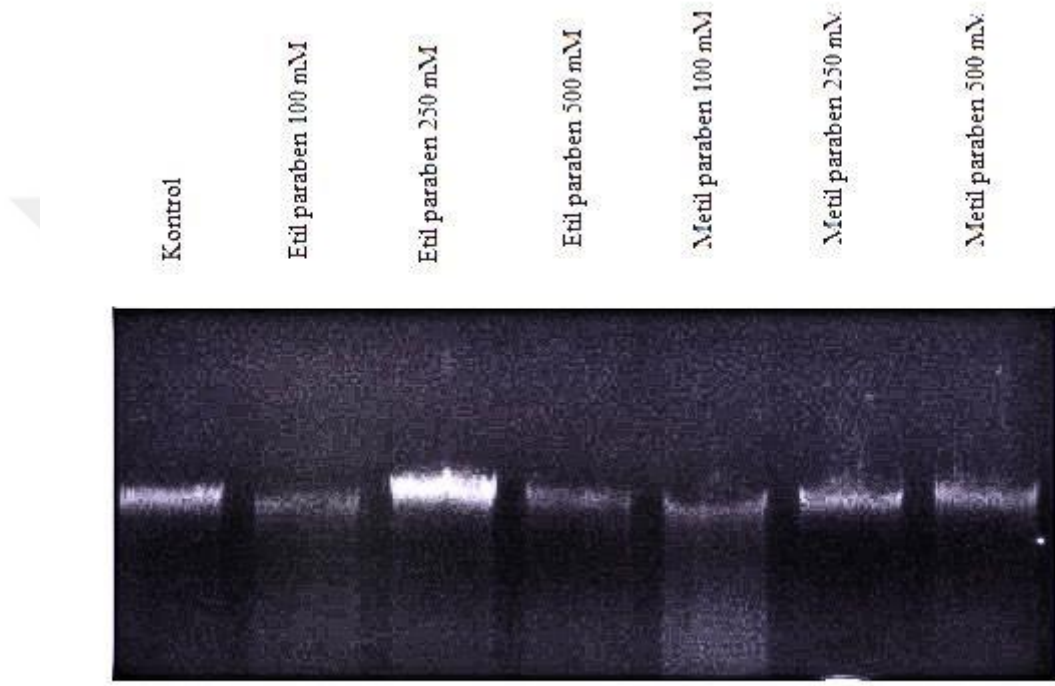
4.2.7. Genomik karar sabitliği (GTS) analizi

ISSR ve IRAP profillerine göre, amplifiye DNA bantlarının varlığı veya yokluğu, her primer için bant yoğunluğundaki eksilme ve artışlar, jel görüntüleme cihazı ile tüm örneklerde belirlenmiştir. Atienzar (1999)'a göre $100-(100*a/n)$ formülünden yararlanılarak her bir primer ürünü için % GTS hesaplanmıştır. a her bir uygulama örneği için tespit edilen IRAP ve ISSR polimorfik profillerini ifade ederken, n ise ilgili primerle negatif kontrol grubunda elde edilen DNA toplam bantı sayısını ifade etmektedir.

5. SONUÇLAR

5.1. Sonuçlar

DNA, % 0,8'lik bir jel içinde 90 dk. boyunca 100 volt, 70 amperde çalıştırılmıştır. UV ışığı altında incelenen DNA görüntüleri Şekil 5.1'de verilmiştir.



Şekil 5.1. UV ışığı altında incelenen DNA görüntüleri

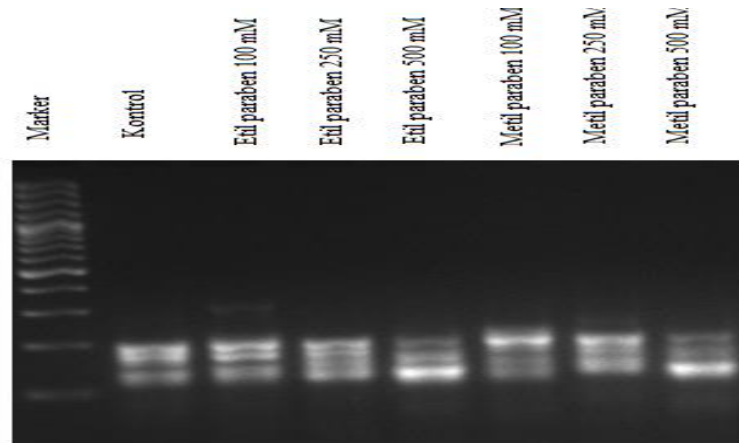
5.1.1. IRAP analiz sonuçları

Zea mays' a uygulanan etil ve metil parabenin 100 Mm, 250 Mm ve 500 Mm lık dozları ve kontrol grubunda genomlarındaki retrotrasposon polimorfizmi belirlemek için IRAP yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde 5 primer (Nikita, 3LTR5, 5LTR1, SIRE1, Sukkula) çalışılmıştır. Uygulanılan etil paraben ve metil paraben dozlarının artması ile GTS değeri azalırken, % polimorfizm artmıştır. Etil paraben uygulamalarında GTS değeri uygulanılan doz artışı ile birlikte %60,7, % 52 ve % 48,9 olurken, metil paraben uygulamalarında bu değer %56,8, % 52,7 ve % 46,4 olarak hesaplanmıştır. Polimorfizm oranı ise etil ve metil paraben konsantrasyonlarının artması ile doğru orantılı bir şekilde

artmıştır. Bu değerler etil paraben için %39,3 ile % 51,1 arasında olurken, metil paraben için % 43,2 ile % 53,6 arasında olmuştur (Tablo 5.1). Sukkula primerine ait jel görüntüsü Şekil 5.2 ‘de verilmiştir.

Tablo 5.1. IRAP analizi GTS ve polimorfizm değerleri

Primerler	Kontrol	Etil paraben 100 mM	Etil paraben 250 mM	Etil paraben 500 mM	Metil paraben 100 mM	Metil paraben 250 mM	Metil paraben 500 mM
Nikita	100	75	57,1	75	62,5	85,7	71
3LTR5	100	71,4	62,5	62,5	44,8	25	33,3
5LTR1	100	50	37,8	25	50	33,3	25
SIRE1	100	62,5	54,6	57,1	71,4	62,5	52,6
SUKKULA	100	44,8	50	25	55,4	57,1	50
% GTS		60,7	52,4	48,9	56,8	52,7	46,4
% Polimorfizm		39,3	47,6	51,1	43,2	47,3	53,6



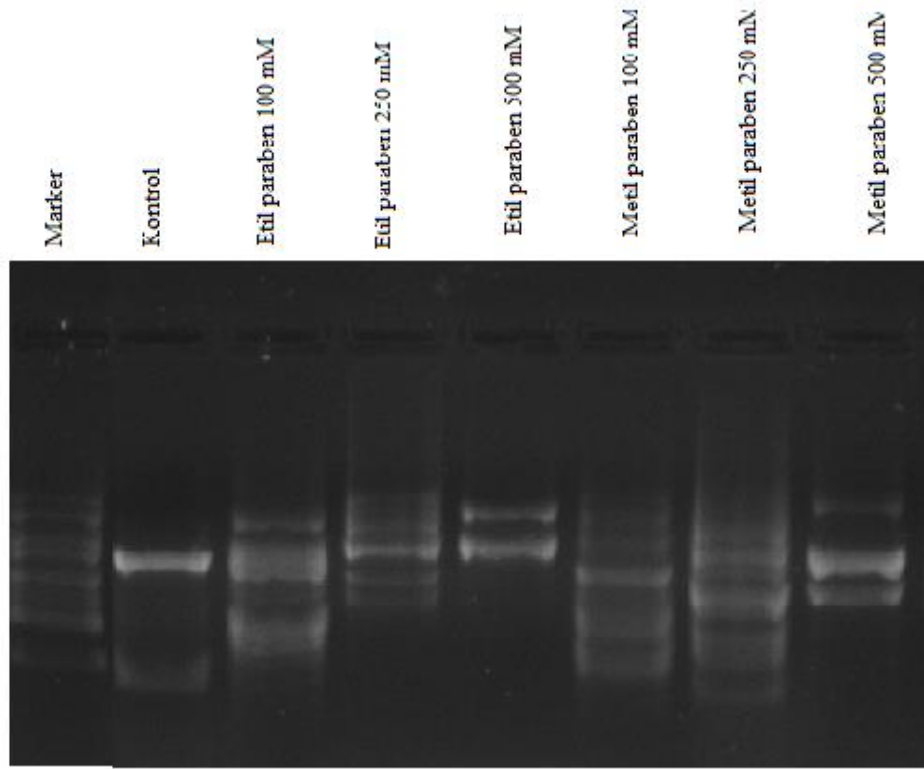
Şekil 5.2. SUKKULA primerinde meydana gelen amplifikasyon ürünleri

5.1.2. ISSR analiz Sonuçları

ISSR yöntemi ile *Zea mays* 'a uygulanan etil ve metil parabenin 100 Mm, 250 Mm ve 500 Mm' lık dozları ve kontrol grubunun genomlarında meydana gelen DNA hasarı belirlenmiştir. ISSR yönteminde 10 primer çalışılmıştır. Çalışılan bütün primerlerde etil ve metil paraben dozlarının artmasına bağlı olarak toplamda % GTS değeri azalırken, toplam % polimorfizm değeri artmıştır. Etil paraben için % GTS değeri %77,2 ile %60,3 arasında olurken, metil paraben için %76,9 ve %65 arasında olmuştur. % Polimorfizm değeri ise etil paraben uygulamaları için %22,8 ile %39,7, metil paraben uygulamaları için ise %23,1 ile %35 arasında olmuştur (Tablo 5.2). UBC816 primerine ait jel görüntüsü Şekil 5.3' de verilmiştir.

Tablo 5.2. ISSR analizi GTS ve polimorfizm değerleri

Primerler	Kontrol	EP 100 mM	EP 250 mM	EP 500 mM	MP 100 mM	MP 250 mM	MP 500 mM
UBC807	100	83.3	71.4	75.7	80	72.8	65
UBC812	100	75.7	62.3	50	75.7	70	62.5
UBC816	100	81.5	71.4	62.5	90	83.3	72.8
UBC830	100	90	83.3	70	66.6	62.5	50
UBC836	100	62.3	57.1	50	81.5	75	68.4
UBC840	100	71.4	65	57.1	71.4	72.8	66.6
UBC841	100	81.5	62.3	48.6	69.5	66.6	71.4
UBC842	100	80	72.5	66.6	83.3	75	58.3
UBC818	100	69.5	66.6	62.5	75	81	70
% GTS		77.2	67.9	60.3	76.9	73.2	65
% Polimorfizm		22.8	32.1	39.7	23.1	26.8	35



Şekil 5.3. UBC816 primerinde meydana gelen amplifikasyon ürünleri

6. TARTIŞMA

Dünyada sanayileşme ve artan nüfusun talepleri doğrultusunda kimyasal maddelerin endüstride kullanımı artmıştır. Belirli bir kaliteyi yakalamak, ekonomik kazanç sağlamak, raf ömrünü uzatmak ve taleplere yetiştirebilmek adına bilinçsizce kullanılan kimyasallar ekosistem için büyük tehdit oluşturmaktadır.

Dünya çapında her geçen gün paraben tüketimi artarken bu parabenlerin atıklarının ortamdaki uzaklaştırılması aşamasında çevreyi kontamine edebilmektedir. Bu sebeple atık su arıtma tesislerinde, kanalizasyon çamurunda, çevrede düzenli depolama alanlarında paraben ve türevlerine rastlanabilmektedir (Gao et al., 2019). Çevresel paraben maruziyetini belirlemeye yönelik yapılan araştırmalarda ziraat alanlarında, yüzey sularında, kanalizasyon, nehir ve içme su kaynaklarında, ev tozlarında parabenlerin varlığı saptanmıştır. Sentetik parabenlere ek olarak, doğal olarak oluşan parabenlerin de (belirli bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından) bu paraben kontaminasyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda yaygın kullanımları nedeniyle insan dokusu ve sıvı örnekleri incelendiğinde anne sütü, plasenta, seminal plazma, yağ dokusu ve kordon kanında parabenler tespit edilmiştir (Shin vd., 2019).

Gıda, temizlik, kozmetik ve farmasötik endüstri başta olmak üzere kullanımı popüler hale gelen parabenlerin güvenliği konusunda yıllardır süregelen kafa karışıklığı günümüzde de devam etmektedir. Yapılan çalışma sonuçlarında parabenler hakkında olumsuzluklar ve negatif etkilerin varlığını ortaya koymaktadır. Hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalar birbiri ile uyumlu olup parabene maruziyetin farklı konsantrasyonlarda insanlarda ve hayvanlarda benzer etkilere sebep olabileceğini göstermektedir (Bledzka vd. 2004).

Parabenlerin insan semen kalitesi ve üreme hormonlarıyla ilişkili yapılan çalışmada parabenlerin sperm anomalilerine sebep olabileceğine dair anlamlı istatistiki ilişki tespit edilmiştir (Jurewicz vd., 2017). Bir başka çalışmada ise parabenlerin sanıldığı kadar güvenli olmadığı ve erkeklerde üreme potansiyeli düşürdüğü tespit edilmiştir (Tavares vd., 2009). Östrojenik aktivitenin değerlendirilmesi için alkil fenoller, klorlu fenoller, parabenler veya bis- ve benzoil fenoller ile tedavi edilen meme kanseri hücrelerinde

östrojene duyarlı genlerin ekspresyon profiline bakılmış ve parabenin östrojenik aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Teresaka vd., 2006).

Yaşamları boyunca bitkiler strese sebep olan birçok etkene maruz kalabilmektedir. Savunma mekanizması ise bitkiyi bu fizyolojik ya da biyokimyasal stres etmenlerinden kaynaklanan stresi engellemek için aktif hale gelmektedir (Büyük ve Aydın, 2012). Stres halinde bitkide retrotransposon adı verilen elementlerde hareketlilik gözlemlenir. Bitkide meydana gelen bu değişimler moleküler markerler yardımıyla belirlenmektedir.

Parabenlerin hayvansal organizmalar üzerindeki genotoksik etkileri tam olarak bilinmemektedir. Bir çalışmada propilparaben ve butilparaben, comet assay ile ölçülen CHO-K1 hücrelerinde doza bağlı DNA hasarına neden olmuş ve eş kromatid değişimi (SCE) ve CA indüklediği ortaya çıkmıştır (Tayama vd., 2008). Başka bir araştırmada propilparabenin memeli hücreleri üzerindeki sitotoksik ve genotoksik etkileri araştırılmıştır. Propilparabenin maymunlardan elde edilen hepatositler üzerindeki toksik etkileri için 50 uM ila 500 uM (9.01 ug/ml ila 90.1 ug/ml) arasında değişen dozlar kullanılarak inceleme yapılmıştır. Maddenin verilmesine bağlı olarak hücreler üzerinde sitotoksik etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Hücre proliferasyonunda doza bağımlı bir azalmanın yanı sıra sitotoksik DNA çift sarmal kırılmalarına ve oksidatif hasara neden olduğu bildirilmiştir. Memeli hücrelerinde parabenlerin genotoksik etkilerine ilişkin daha fazla araştırmaya duyulan ihtiyaç vurgulanmıştır (Martin vd., 2010).

Metil ve propil parabenlerin *Salmonella typhimurium*'un TA100, TA98, TA1535 ve TA1537 suşlarına karşı mutajenik potansiyelinin Ames test sistemi kullanılarak değerlendirildiği çalışmada, *Salmonella typhimurium* TA100 ve TA98 suşları ile *E. coli* D-2 suşunun kültürlerinin, DMSO ile karıştırılmış S9 propilparaben karışımının varlığında veya yokluğunda herhangi bir indükleme göstermediği belirlenmiştir (Sony, 2002).

S. typhimurium TA98 ve TA100 suşlarının kullanıldığı ve 5- 100 µg/plaka parabenlerin farklı 5 konsantrasyonunun mutajenik etkilerinin Ames S9 (+) ve S9 (-) testi kullanılarak yorumlandığı bir tez araştırmasında, mutasyon oranlarının artan paraben konsantrasyonları ile paralel olarak arttığı görülmüştür (Aydoğan, 2016). Bir başka

çalışmada *Bacillus subtilis* ile yapılan Rec deneyinde sonuçlar negatifken, *E. coli* ile yapılan Rec deneyinde sonuçların pozitif olduğu belirlenmiştir (Morita vd., 1981).

Parabenlerin bitkisel organizmalarda genotoksik etkisiyle ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır. Paraben' in bitki üzerindeki etkilerinin *Allium cepa* L. test sistemi kullanarak incelendiği çalışmalarda elde edilen sonuçlar, parabenin yüksek genotoksik etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Kurt vd., 2018; Todorovac vd., 2021).

Kurt vd. (2022) yaptıkları çalışmada *Allium cepa*'da parabenin toksik etkisine karşı *Nasturtium officinale* R. Br. (su teresinin) yaprak ekstraktlarının iyileştirici etkisini araştırmışlardır. Her çalışma grubundaki toksisite fizyolojik, sitogenetik, biyokimyasal ve anatomik parametrelerle araştırılmıştır. Genotoksisite mekanizması için DNA paraben etkileşimi spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Paraben mitotik indeksi azaltırken aynı zamanda çimlenme ile ilgili parametrelerde de azalmaya sebep olmuştur. Kök ucu hücrelerine paraben uygulanması ile MN frekansı, kromozom anormallikleri artarak yüksek genotoksik etki gözlenmiştir.

Coulter vd. (2018) fizyolojik, sitogenetik ve anatomik parametreleri kullanarak soğanlarda metil paraben kaynaklı toksisiteyi araştıran bir çalışma yapmıştır. Paraben uygulamasının ağırlık artışı, kök uzunluğu, çimlenme yüzdesi ve mitotik indeks değerlerinde önemli bir azalmaya, mikronükleus sayısında ve kromozomal anormalliklerde ise önemli bir artışa sebep olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda etil ve metil parabene maruz bırakılan mısır bitkisinde genotoksik etki tespit edilmiştir. Maruziyet sonrası ortaya çıkan genetik değişiklikler IRAP ve ISSR analizleri ile tespit edilmiştir. GTS oranlarının artan dozla ters orantılı olduğu, meydana gelen polimorfizmin artan doza paralel olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamız metil ve etil parabenin bitkide meydana getirdiği DNA hasarının etkisinin tespit edildiği ilk moleküler çalışma olması yönünden literatüre katkı sağlayacaktır. ISSR ve IRAP analiz yöntemleri paraben ve türevlerinin meydana getirdiği DNA hasarının tespitinde başarıyla kullanılabildiği tespit edilmiştir.

7. ÖNERİLER

Bilinçsizce kullanılan kimyasalların sebep olduğu çevre kirliliği giderek artan dünya nüfusu da göz önüne alındığında ciddi problemlerin habercisi olduğunu rahatlıkla söyleyebiliriz. Parabenlerin belirlenen negatif etkilerinin risk oluşturmaları dışında gıda, temizlik, kozmetik ve farmasötik endüstrisinde giderek artan kullanımı çevreye salınımını da artırmaktadır. Yapılan çalışmalar parabenlerin sudaki yaşam üzerine özellikle endokrin bozucu etkisini ortaya koymaktadır. Bu durum koruyucu etkisi nedeniyle popüler bir kullanıma sahip olan parabenin ekosisteme olumsuz yönde etkilerinin olabileceğini göstermektedir.

Parabenlerin negatif etkileri hayvansal ve bitkisel birçok organizma ile ortaya konmuştur. Çalışmamızda mısır bitkisi üzerinde parabenlerin genotoksik etkisi tespit edilmiştir. Bu durum değerlendirilecek olursa parabenlerin kullanımının ekosisteme vereceği zarar hakkında kullanıcıların daha fazla bilgilendirilmesi gerektiğini öngörmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Ågren, J. A., and Clark, A. G. (2018) “Selfish genetic elements”, *PLoS Genetics*, 14(11), e1007700.
- Agro Medya, (2021) “Mısır üretiminde tarihi rekor beklentisi”, *Agro Medya Tarım ve Hayvancılık Dergisi*, 44, 26-28.
- Albero, B., Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., and Tadeo, J. L. (2012) “Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain)”, *Journal of Hazardous Materials*, 239, 48-55.
- Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü. ve Demirağ, K. (2000) “Gıda katkı maddeleri analiz yöntemleri”, *Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları*, 22, 1-244.
- Ali, Z., Ahmad, V. U., Zahid, M., and Tareen, R. B. (1998) “Benzoic acid derivatives from *Stockia brahuica*”, *Phytochemistry*, 48(7), 1271-1273.
- Ayar, A. (2013) “Bazı parabenlerin genotoksik etkilerinin in vivo ve in vitro şartlarda kısa süreli test teknikleri ile belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 4-84.
- Aydoğan M., (2016) “Parabenin Ames Salmonella/mikrozom testi ile mutajenik aktivitesinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Giresun.
- Aydoğan, M., Çavuşoğlu, K., and Yalçın, E. (2018) “Ames/Salmonella/Mikrozom Testi ile Parabenin (p-hidroksibenzoik asit metil ester) Mutajenik Aktivitesinin Araştırılması”, *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*, 7(3), 181-188.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., and Vivanco, J. M. (2003) “Root specific elicitation and exudation of fluorescent β -carbolines in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa*”, *Plant physiology and Biochemistry*, 41(4), 345-353.
- Bereketoglu, C., and Pradhan, A. (2019) “Comparative transcriptional analysis of methylparaben and propylparaben in zebrafish”, *Science of the Total Environment*, 671, 129-139.
- Bionetics, L. (1974) “Summary of Mutagenicity Screening Studies: Host-Mediated Assay, Cytogenetics, Dominant Lethal Assay (Contract FDA 71-268, Compound FDA 71-38, methylparaben)”, NTIS No. In NTIS No. PB-245-459. National Technical Information Service Lyon.
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., and Wąsowicz, W. (2014) “Parabens from environmental studies to human health”, *Environment International*, 67, 27-42.
- Boehm, E. E., & Maddox, D. N. (1972) “Recent applications of preservatives for pharmaceuticals”, *Manufacturing Chemist and Aerosol News*, 43(8), 21.

- BULUT, H. (2020) “Mısır (*Zea mays* L.)’da Tuz Stresine Karşı Humik Asidin Etkisi”, *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences*, 10(1), 11-18.
- Bulut, H., and Yıldırım Doğan, N. (2018) “Determination by molecular methods of genetic and epigenetic changes caused by heavy metals released from thermal power plants”, *Applied Biological Chemistry*, 61(2), 189-196.
- Büyük, İ., AYDIN, S. S., and Sümer, A. R. A. S. (2012) “Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 69(2), 97-110.
- Cenkci, S., Yıldız, M., Ciğerci, İ. H., Bozdağ, A., Terzi, H., and Terzi, E. S. A. (2010) “Evaluation of 2, 4-D and Dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1558-1564.
- Chembook, (2022) “Chemicalbook and related products for scientific research”, https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB5119772.htm, Son erişim tarihi: 10.12.2022.
- Chen, J., Ahn, K. C., Gee, N. A., Gee, S. J., Hammock, B. D., and Lasley, B. L. (2007) “Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(3), 278-284.
- Dambal, V. Y., Selvan, K. P., Lite, C., Barathi, S., and Santosh, W. (2017) “Developmental toxicity and induction of vitellogenin in embryo-larval stages of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to methyl Paraben”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 141, 113-118.
- Daniel, J. W. (1986) “Metabolic aspects of antioxidants and preservatives”, *Xenobiotica*, 16(10-11), 1073-1078.
- Darbre, P. D., Byford, J. R., Shaw, L. E., Horton, R. A., Pope, G. S., and Sauer, M. J. (2002) “Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo”, *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 22(4), 219-226.
- Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S. (2004) “Concentrations of parabens in human breast tumours”, *Journal of Applied Toxicology*, 24 (1), 5–13
- Decker, A. H. (2015) “Associations between Butylparaben and Thyroid Levels in Females aged 12 and over”, *Public Health Theses: Thesis, Georgia State University*, 21(5), 3-31.
- Demidchik, V. (2015) “Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology”, *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.

- Dobbins, L. L., Usenko, S., Brain, R. A., and Brooks, B. W. (2009) “Probabilistic ecological hazard assessment of parabens using *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*”, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2744-2753.
- FAO, Mısır Üretimi <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/maize/en/>, Son erişim tarihi: 14.02.2022.
- FDA, USA Food and drug administration <https://www.fda.gov/cosmetics/resources-consumers-cosmetics/cosmetics-safety-qa-parabens> , Son erişim tarihi: 18.02.2022 .
- Fransway, A. F., Fransway, P. J., Belsito, D. V., Warshaw, E. M., Sasseville, D., Fowler Jr, J. F., and Reeder, M. J. (2019) “Parabens”, *Dermatitis*, 30(1), 3-31.
- Gao, Y., Ji, Y., Li, G. ve An, T., (2016) “Theoretical investigation on the kinetics and mechanisms of hydroxyl radical-induced transformation of parabens and its consequences for toxicity: Influence of alkylchain length”, *Water Research*, 91, 77-85.
- Gebhardt, C., Ritter, E., Debener, T., Schachtschabel, U., Walkemeier, B., Uhrig, H., and Salamini, F. (1989) “RFLP analysis and linkage mapping in *Solanum tuberosum*”, *Theoretical and Applied Genetics*, 78(1), 65-75.
- González-Mariño, I., Quintana, J. B., Rodríguez, I., and Cela, R. (2009) “Simultaneous determination of parabens, triclosan and triclocarban in water by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry”, *Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry*, 23(12), 1756-1766.
- Grover, A., & Sharma, P. C. (2016) “Development and use of molecular markers: past and present”, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 290-302.
- Inai, K., Aoki, Y., Akamizu, H., Eto, R., Nishida, T., and Tokuoka, S. (1985) “Tumorigenicity study of butyl and isobutyl p-hydroxybenzoates administered orally to mice”, *Food and Chemical Toxicology*, 23(6), 575-578.
- Jurewicz, J., Radwan, M., Wielgomas, B., Dziewirska, E., Karwacka, A., Klimowska, A., ... and Hanke, W. (2017) “Human semen quality, sperm DNA damage, and the level of reproductive hormones in relation to urinary concentrations of parabens”, *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 59(11), 1034-1040.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., and Guwy, A. J. (2008) “The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales”, UK. *Water Research*, 42(13), 3498-3518.

- Kurt D., Çavuşoğlu K; Yalçın E. (2018) “Koruyucu Madde Paraben’in Allium cepa L.’daki Fizyolojik, Anatomik ve Sitogenetik Etkilerinin Araştırılması”, *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 8(2): 65-71.
- Kurt, D., Yalçın, E., & Çavuşoğlu, K. (2022) “GC–MS and HPLC supported phytochemical analysis of watercress and the protective role against paraben toxicity”, *Environmental Science and Pollution Research*, 1-14.
- Li, W., Sun, Y., Joseph, J., Fitzloff, J. F., Fong, H. H., & van Breemen, R. B. (2003) “p-Hydroxybenzoic acid alkyl esters in Andrographis paniculata herbs, commercial extracts, and formulated products”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(2), 524-529.
- Maddox, D. N. (1982) “The role of p-hydroxybensoates in modern cosmetics”, *Cosmet. Toilet*, 97, 85-88.
- Martin J.M., Peropadre A., Herrero O., Freire P.F., Labrador V. and Hazen M.J. (2010) “Oxidative DNA damage contributes to the toxic activity of propylparaben in mammalian cells”, *Mutation Research*, 702, 86-91.
- Matthews, C., Davidson, J., Bauer, E., Morrison, J. L., and Richardson, A. P. (1956) “p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives II.: acute and chronic toxicity in dogs, rats, and mice”, *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)*, 45(4), 260-267.
- Matwiejczuk, N., Galicka, A., and Brzóska, M. M. (2020) “Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens”, *Journal of Applied Toxicology*, 40(1), 176-210.
- McCLINTOCK, B., (1950) “The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 36, 344-355.
- Morita, K., Ishigaki, M., and Abe, T. (1981) “Mutagenicity of materials related with cosmetics”, *Journal of Society of Cosmetic Chemists of Japan*, 15(3), 243-253.
- National Center for Biotechnology Information (2022) PubChem Compound Summary for CID 7456, “Methylparaben”, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylparaben>, Son erişim tarihi: 10.02.2022.
- Nishihama, Y., Yoshinaga, J., Iida, A., Konishi, S., Imai, H., Yoneyama, M., and Shiraishi, H. (2016) “Association between paraben exposure and menstrual cycle in female university students in Japan”, *Reproductive Toxicology*, 63, 107-113.
- Oishi, S. (2002) “Effects of propyl paraben on the male reproductive system”, *Food and Chemical Toxicology*, 40(12), 1807-1813.

- Okubo, T., Yokoyama, Y., Kano, K., and Kano, I. (2001) "ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR", *Food and Chemical Toxicology*, 39(12), 1225-1232.
- Peng, X., Yu, Y., Tang, C., Tan, J., Huang, Q., and Wang, Z. (2008) "Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China", *Science of the Total Environment*, 397(1-3), 158-166.
- PubChem, "Public repository for information on chemical substances", <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethylparaben>, Son erişim tarihi: 10.02.2022.
- Pugazhendhi, D., Pope, G. S., and Darbre, P. D. (2005) "Oestrogenic activity of p-hydroxybenzoic acid (common metabolite of paraben esters) and methylparaben in human breast cancer cell lines", *Journal of Applied Toxicology: An International Journal*, 25(4), 301-309.
- Rose, D. J., Inglett, G. E., and Liu, S. X. (2010) "Utilisation of corn (Zea mays) bran and corn fiber in the production of food components", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(6), 915-924.
- Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J., and Sumpter, J. P. (1998) "Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic", *Toxicology and Applied Pharmacology*, 153(1), 12-19.
- Roy, N. S., Choi, J. Y., Lee, S. I., and Kim, N. S. (2015) "Marker utility of transposable elements for plant genetics, breeding, and ecology: a review", *Genes & genomics*, 37(2), 141-151.
- Seven, B., Yalçın, E., Acar, A., Yapar, K., ve Çavuşoğlu, K. (2017) "Albino Farelerde Paraben Tarafından Oluşturulan Genotoksitenin Araştırılması: Isırgan Otu Özütünün Koruyucu Rolü", *Cumhuriyet Science Journal*, 38(3), 572-80.
- Sheskey, P. J., Cook, W. G., and Cable, C. G. (Eds.) (2017) Handbook of pharmaceutical excipients 8th Edition, *Pharmaceutical Press*, London, 130-810.
- Shin, M.Y., Shin, C., Choi, J.W., Lee, J., Lee, S. and Kim, S. (2019) "Pharmacokinetic profile of propyl paraben in humans after oral administration", *Environmental International*, 130 (2019) 104917.
- Sinan, G. H. (2018) "Paraben ve türevlerinin insan lenfosit DNA'sı üzerindeki genotoksik etkilerinin RAPD-PCR ve comet teknikleri ile araştırılması", Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 12-88.
- Soni, M.G., Carabin, I.G. and Burdock, G.A. (2005) "Safety assessment of esters of phydroxybenzoic acid (parabens)", *Food Chemical Toxicology*, 43, 985- 1015.

- Sox T.E. (1997) “Mechanisms of action of cosmetic preservatives. In: Braman, D.K (Ed.), *Cosmetic Microbiology: A Proactical Handbook*”, **CRC Press LLC, Boca Roton**, 163-167.
- Tavares, R. S., Martins, F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J., and Peixoto, F. P. (2009), “Parabens in male infertility—Is there a mitochondrial connection?”, **Reproductive Toxicology**, 27(1), 1-7.
- Tayama, S., Nakagawa, Y., and Tayama, K. (2008) Genotoxic effects of environmental estrogen-like compounds in CHO-K1 cells”, **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 649(1-2), 114-125.
- TEPGE, “Tarım Ürünleri Raporu”, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2022-Ocak%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Rapor%C4%B1/M%C4%B1s%C4%B1r,%20Ocak-2022%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasa%20Raporu--+.pdf>, Son erişim tarihi: 10.02.2022.
- Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M., and Kiyama, R. (2006) “Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis-and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity”, **Toxicology Letters**, 163(2), 130-141.
- Todorovac, E., Durmisevic, I., Cajo, S., Haverić, A., and Mesic, A. (2021) “Evaluation of DNA and cellular damage caused by methyl-, ethyl- and butylparaben in vitro”, **Toxicological & Environmental Chemistry**, 103(1), 85-103.
- Tsukamoto, H., and Terada, S. (1964) “Metabolism of drugs. XLVII. Metabolic fate of p-hydroxybenzoic acid and its derivatives in rabbit”, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 12(7), 765-769.
- Van Meeuwen, J. A., Van Son, O., Piersma, A. H., De Jong, P. C., and Van Den Berg, M. (2008) “Aromatase inhibiting and combined estrogenic effects of parabens and estrogenic effects of other additives in cosmetics”, **Toxicology and Applied Pharmacology**, 230(3), 372-382.
- Yildirim, N., Sunar, S., and Agar, G. (2020) “Effects Of Carbendazim On Dna Damage And Retrotransposon Polymorphism IN Zea mays”, **Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)**, 19(8).
- Yorgancılar, M., Yaşar, M. A., ve Atalay, (2019) “Mısır ıslahında indirgeyici hatların kullanımı ve dihaploidizasyon”, **Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi**, 8(1), 170-177.



EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Al-Hamadani T. S. M., Yıldırım Doğan N. (2022) Bazı Parabenlerin Zea Mays'ta Meydana Getirdiği Genotoksik Etkinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması.

International Academic Student Studies Congress

