

**T.C.
ERZİNCAN BİNALİ YILDIRIM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**İNSAN LENFOSİTLERİNDE GIDA BOYASI AMARANTHIN
MEYDANA GETİRDİĞİ GENETİK VE EPİGENETİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Sema KIRTILLI

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

**GENETİK VE BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ERZİNCAN
2022
Her Hakkı Saklıdır.**

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN LENFOSİTLERİNDE GIDA BOYASI AMARANTHIN MEYDANA GETİRDİĞİ GENETİK VE EPIGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Sema KIRTILLI

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

Danışman: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Gıda boyaları, gıdaların doğal rengini yeniden kazandırmak, daha canlı ve iştah açıcı renkler oluşturarak ürünleri tüketiciler için cazip hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır. Gıda boyaları arasında yer alan azo boyalar çoğunlukla bu amaç için tercih edilmektedir. Bir azo boya olan amaranth, gıda sektörü dışında kozmetik, tekstil ve kağıt üretimi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Amaranth gıda boyasının, bulundurduğu azo fonksiyonel grup (-N=N-) ve aromatik halka yapısı sebebiyle sağlığa zararlı olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada amaranthın insan lenfositlerinde meydana getirdiği genetik ve epigenetik değişiklikler IRAP ve ISSR moleküler yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Bir kadın ve iki erkek bireyden alınan periferik kanın, lenfosit kültürü için inkübe edildiği 72 saat içerisinde, farklı doz ve sürelerde (24. saatte 1 mM, 4 mM, 8 mM; 48. Saatte 1 mM, 4 mM, 8 mM) amaranth gıda boyası uygulanmıştır. PCR analiz sonuçlarına göre % polimorfizm ve GTS değerleri hesaplanmıştır. Lenfositlere uygulanan amaranthın doz ve süresinin artışına bağlı olarak, polimorfizm oranında artışa, GTS oranında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir. Literatürde amaranth gıda boyası ve insan lenfositleri üzerinde, IRAP ve ISSR yöntemi kullanılarak yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Her iki yöntemde insan lenfosit hücrelerinde meydana gelen genotoksik etkilerin belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır.

2022, 79 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Amaranth, Genotoksisite, IRAP, ISSR, Lenfosit hücresi

ABSTRACT

Master Thesis

INVESTIGATION OF GENETIC AND EPIGENETIC CHANGES IN HUMAN LYMPHOCYTES CAUSED BY THE FOOD DYE AMARANTH

Sema KIRTILLI

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

Supervisor: Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN

Food dyes are used to restore the natural color of foods, to create more vivid and appetizing colors and to make products attractive to consumers. Azo dyes, which are among the food dyes, are mostly preferred for this purpose. Amaranth, an azo dye, is used in many fields such as cosmetics, textile and paper production, apart from the food sector. Amaranth food coloring is considered to be harmful to health due to its azo functional group ($-N=N-$) and aromatic ring structure. In this study, genetic and epigenetic changes caused by amaranth in human lymphocytes were investigated using IRAP and ISSR molecular methods. Amaranth food coloring was applied at different doses and times (1 mM, 4 mM, 8 mM at 24 hours; 1 mM, 4 mM, 8 mM at 48 hours) within 72 hours of incubation of peripheral blood taken from one female and two male individuals for lymphocyte culture. According to PCR analysis results, % polymorphism and GTS values were calculated. It was determined that depending on the increase in the dose and duration of amaranth applied to lymphocytes, it caused an increase in the rate of polymorphism and a decrease in the rate of GTS. There is no study in the literature on amaranth food coloring and human lymphocytes using IRAP and ISSR methods. Both methods have been successfully used to determine the genotoxic effects on human lymphocyte cells.

2022, 79 Pages

Keywords: Amaranth, Genotoxicity , IRAP, ISSR, Lymphocyte cell

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitim sürecimde bilgi, beceri, ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmamda bana destek olan, cesaret veren, bana inanan değerli danışman hocam, Prof. Dr. Nalan YILDIRIM DOĞAN'a, çalışmamızda kullanılan DNA izolasyon kitini temin eden ve bilgilerini paylaşarak büyük katkı sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KUZUCU'ya, DNA izolasyon çalışmalarında desteğini esirgemeyen Uğur DURMUŞ'a katkılarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecimde en büyük fedakârlığı gösteren çocuklarım Başar KIRTILLI, Çağan KIRTILLI ve kıymetli eşim Ercan KIRTILLI'ya minnet ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Sema KIRTILLI

Ağustos, 2022

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Amaranth Gıda Boyasıyla Yapılmış Çalışmalar.....	5
2.2. IRAP Yöntemi ile Yapılmış Genetik ve Epigenetik Çalışmalar.....	8
2.3. ISSR Yöntemi ile Yapılmış Genetik ve Epigenetik Çalışmalar.....	10
3. KURAMSAL TEMELLER.....	13
3.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	13
3.2. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması.....	13
3.2.1. Koruyucular	13
3.2.2. Yapıyı hazırlama ve pişme özelliğini geliştirenler.....	14
3.2.3. Besin değerini koruyucu ve geliştiriciler	14
3.2.4. Aroma vericiler ve renklendiriciler	14
3.2.4.1. Azo boyalar.....	15
3.2.4.2. Amaranth gıda boyası.....	15
3.3. Genetik Değişiklikler	16
3.4. Epigenetik Değişiklikler	16
3.5. Transpozonlar.....	17
3.5.1. Retrotranspozon	18
3.5.2. DNA transpozonu.....	18
3.6. Genotoksisite Testlerinde Kullanılan Yöntemler.....	18
3.6.1. Genotoksisite testlerinde kullanılan PCR temelli olmayan yöntemler	18
3.6.1.1. Ames testi (Bakteriyel Geri Mutasyon testi)	18
3.6.1.2. Comet testi (Tek Hücre Jel Elektroforez yöntemi)	19

3.6.1.3. Kromozom Anormallikleri (KA) testi	19
3.6.1.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) testi	20
3.6.1.5. Mikronükleus (MN) testi	21
3.6.1.6. Fare Lenfoma testi	21
3.6.1.7. Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz İleri Mutasyon testi ..	22
3.6.1.8. Rodent Dominant Letalite testi	22
3.6.1.9. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon testi (SMART).....	22
3.6.2. Genotoksisite testlerinde kullanılan PCR temelli yöntemler	23
3.6.2.1. RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)	23
3.6.2.2. ISSR (Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)	24
3.6.2.3. IRAP (Retrotanspozon arası çoğaltılmış polimorfizm)	25
3.6.2.4. REMAP (Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi) ...	26
3.6.2.5. CRED-RA (Çift restriksiyon enzimli sindirim-rastgele çoğaltma) ...	27
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
4.1. Materyal	28
4.1.1. Çalışmada kullanılan lenfosit hücresi	28
4.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları	28
4.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler	29
4.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar	30
4.2. Yöntem	31
4.2.1. Lenfosit kültürü	31
4.2.1.1. Kromozom medyumunun hazırlanması	31
4.2.1.2. Kan örneklerinin alınması	31
4.2.1.3. Kan örneklerinin kromozom medyumlarına aktarılması	31
4.2.2. Amaranth gıda boyasının uygulama dozlarının hazırlanması	32
4.2.3. Lenfosit kültürlerinin besiyerinden uzaklaştırılması	32
4.2.4. Lenfositlerden DNA izolasyonu	32
4.2.5. DNA konsantrasyon ve kalite tayini	33
4.2.6. IRAP PCR	33
4.2.7. ISSR PCR	35
4.2.8. IRAP PCR ürünlerinin jel elektroforezi	36
4.2.9. ISSR PCR ürünlerinin jel elektroforezi	37

4.2.10. GTS (Genomik kararlılık sabitliği) hesaplanması.....	38
5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
5.1. DNA Saflık ve Miktar Ölçüm Bulguları.....	39
5.1.1. Lenfositlerden izole edilen DNA'ların jel elektroforezi.....	40
5.2. IRAP PCR Analizleri	40
5.2.1. IRAP PCR polimorfizm ve GTS analizleri.....	42
5.3. ISSR PCR analizleri.....	44
5.3.1. ISSR PCR polimorfizm ve GTS analizleri	51
6. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	54
6.1. Sonuç.....	54
6.1.1. IRAP analiz sonuçları	56
6.1.2. ISSR analiz sonuçları	57
6.2. Tartışma.....	57
KAYNAKLAR	64
EKLER.....	78
Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Toksik ajanla temas sonrası oluşan toksisitenin oluşum basamakları	3
Şekil 3.1. Amaranth yapısal formülü	16
Şekil 5.1. İzole edilen DNA'ların jel görüntüsü	40
Şekil 5.2. Nikita-E2647 primer jel görüntüsü	40
Şekil 5.3. 3LTR-5 primer jel görüntüsü	41
Şekil 5.4. 5LTR-1 primer jel görüntüsü	41
Şekil 5.5. SIRE-1 primer jel görüntüsü	42
Şekil 5.6. Sukkula primer jel görüntüsü	42
Şekil 5.7. UBC807 primer jel görüntüsü	44
Şekil 5.8. UBC810 primerJel görüntüsü	44
Şekil 5.9. UBC812 primer jel görüntüsü	45
Şekil 5.10. UBC816 primer jel görüntüsü	45
Şekil 5.11. UBC817 primer jel görüntüsü	46
Şekil 5.12. UBC868 primer jel görüntüsü	46
Şekil 5.13. UBC825 primer jel görüntüsü	47
Şekil 5.14. UBC830 rimer jel görüntüsü	47
Şekil 5.15. UBC836 primer jel görüntüsü	48
Şekil 5.16. UBC840 primer jel görüntüsü	48
Şekil 5.17. UBC848 primer jel görüntüsü	49
Şekil 5.18. UBC856 primer jel görüntüsü	49
Şekil 5.19. UBC841 primer jel görüntüsü	50
Şekil 5.20. UBC842 primer jel görüntüsü	50
Şekil 5.21. UBC899 primer jel görüntüsü	51
Şekil 5.22. UBC818 primer jel görüntüsü	51

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Araştırmada yer alan cihazlar ve markaları	28
Tablo 4.2. Lenfosit kültürü, madde uygulaması ve DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar	30
Tablo 4.3. IRAP,ISSR PCR ve UV görüntülemeye kullanılan kimyasallar	30
Tablo 4.4. IRAP’da kullanılan primerler, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları	33
Tablo 4.5. IRAP PCR bileşenleri ve miktarları.....	34
Tablo 4.6. IRAP PCR döngü protokolü	34
Tablo 4.7. ISSR’de kullanılan primerler,baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları.....	35
Tablo 4.8. ISSR PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	36
Tablo 4.9. ISSR PCR döngü protokolü.....	36
Tablo 5.1. İnsan lenfositlerinden elde edilen DNA’ların miktar ve saflıkları	39
Tablo 5.2. IRAP PCR polimorfizm ve GTS tablosu.....	43
Tablo 5.3. ISSR PCR polimorfizm ve GTS tablosu	52

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
°	Derece
°C	Santigrat derece
bp	Baz çifti
C	Sitozin
G	Guanin
dk	Dakika
g	Gram
kb	Kilo baz
l	Litre
M	Molar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

Kısaltmalar

A	Amper
bç	Baz çifti
CBMN	Sitokinez Bloke Mikronükleus
CRED-RA	Çift Restriksiyon Enzimli Sindirim-Rastgele Çoğaltma
Ct	Eşik döngüsü
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotitfosfatlar
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
g	Gram

GKM	Gıda Katkı Maddeleri
GTS	Genomik Kararlılık Stabilitesi
IRAP	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
ISSR	Retrotranspozonlar Arası Çoğaltım Polimorfizmi
L	Litre
LTR	Long Terminal Repeat –Uzun uç tekrarları
M	Molar
Mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Clorid
ml	Mililitre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
OD ₂₆₀	260 nm’de Okuma Değeri
OD ₂₈₀	280 nm’de Okuma Değeri
P	Fosfat
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
REMAP	Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltım Polimorfizmi
RNA	Ribo Nükleik Asit
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
sn	Saniye
SSR	Basit Dizi Tekrarları
TBE	Tris Borat EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIS	Trizma Base
UV	Ultraviyole
V	Volt

1. GİRİŞ

Günümüz şartlarında insanlar hazır gıdaları oldukça fazla tüketmektedirler. Hazır gıdaların içeriğinde yer alan gıda katkı maddeleri, doğru miktarlarda tüketilmediği zaman insan sağlığı açısından çok ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Dr. George Herbert'in haklı olarak söylediği gibi, “Bir hastalığın babası ne olursa olsun, anası kötü beslenmedir” (Mishra, 2020). Teknik olarak renklendirici katkı maddeleri, takviye edildikleri besinlere, kozmetik malzemelere, ilaçlara ve insanlara verildiğinde istenilen renkleri kazandıran pigment maddelerine ya da boyalara denilmektedir. Gıda boyaları; gıdaların işlenmesi ve depolanması esnasında yitirilen taze rengi tekrar canlandırmak, solan rengi güçlendirmek, renksiz besini renklendirmek, kalitesiz bir ürünü maskeleyerek tüketiciler için cazip hale getirmek amacıyla gıdalara eklenmektedirler (Gökmen vd., 2001). Bu boyalar, hem toksisiteye hem de mutant gen oluşumuna neden olarak mutajenik etkiyi ortaya çıkarıp, insan sağlığını tehdit eden bir risk kaynağı olabilmektedir (Mpountoukas vd., 2010). Sağlıksız işlenmiş gıdalar günlük beslenmemizin bir parçası haline gelmiştir. Bu tür gıdalara genellikle, genotoksik veya kanserojen özelliklere sahip gıda renklendiricileri eklenmektedir. Bu nedenle sentetik boyalar ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Sentetik gıda boyası içeren yiyecek tüketiminin son 50 yılda artmış olduğu ve çocuklar tarafından yoğun olarak tüketildiği bilinmektedir (Mishra, 2020).

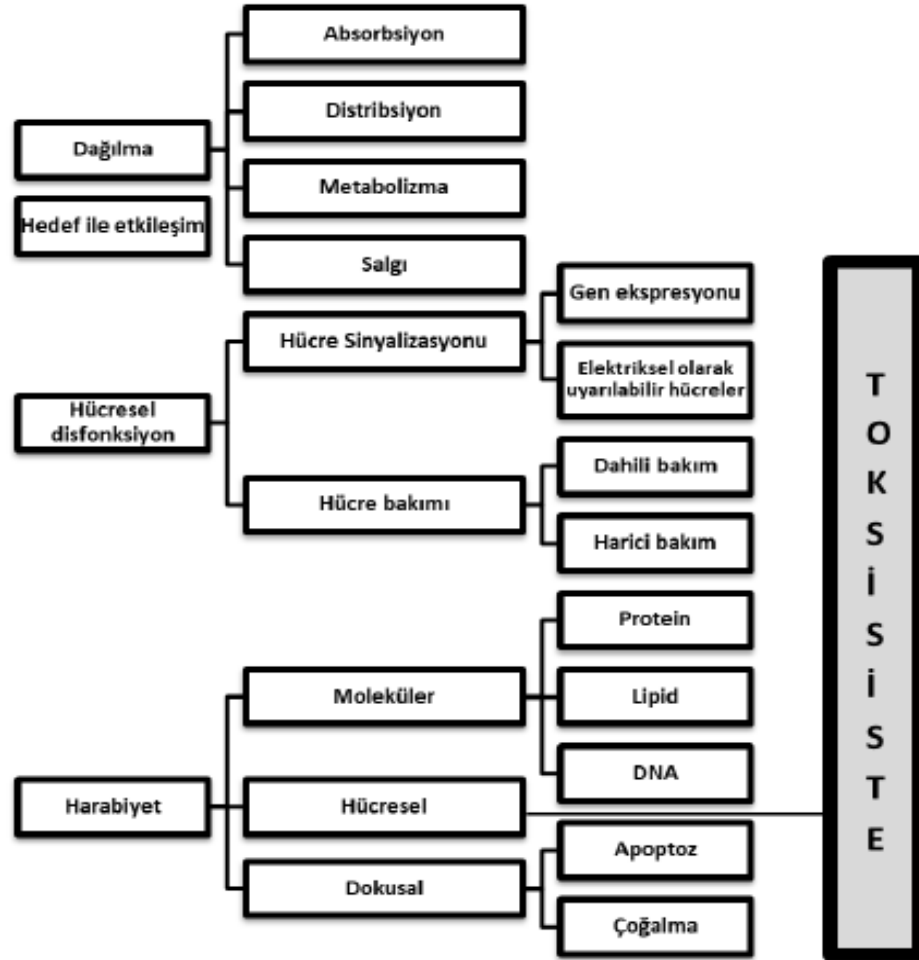
Sentetik bir boya olan amaranth; alkolsüz içecekler, meyve aromalı içecekler, süt ürünleri, konserveler, toz içecekler, toz krema, hazır çorbalar, şekerlemeler ve birçok sos çeşidinde, renklendirici madde olarak kullanılmaktadır (Atlı, 2010). Amaranth gıda sektörü dışında kozmetik, tekstil ve kağıt üretimi gibi birçok alanda talep görmektedir. FDA (ABD Gıda ve ilaç idaresi) tarafından amaranth (E123) gıda boyası, kullanılmasına izin verilmesi konusunda en çok tartışılan sentetik boyalar arasında yer almaktadır. Morumsu kırmızı renk veren amaranth boyası, 1908 yılından itibaren gıda sanayisinde kullanılmaya devam etmiş, fakat ABD’de tüketilmesi tamamen yasaklanmıştır. Rus araştırmacılar tarafından 1970’de yapılan bir deneyde amaranthın kanserojen olduğu ve embriyolarda toksik etki oluşturduğu öne sürülmüştür. Bunun üzerine FDA Rus araştırmacıların iddalarının doğru olduğunu belgeleyen bir çalışma yapmıştır. Sonrasında farklı araştırmalar, deneyler yapılmış ancak bu renklendiricinin

güvenirliliğinden şüphe edildiğinden 1976'da gıda alanında kullanımına izin verilmemiştir. Tüm bu olumsuz gelişmeler amaranthın besinlere ilave edilmesine, diğer ülkelerde kırmızı renk olarak tercih edilmesine engel olamamıştır (Edlefsen ve Brewer, 1996).

Amaranth gıda boyasının, bulundurduğu azo fonksiyonel grub ($-N=N-$) ve aromatik halka yapısı sebebiyle sağlığa zararlı olduğu düşünülmektedir (Mpountoukas vd., 2010). Gıda Katkı Maddeleri Ekspert Komitesinin amaranthın insan sağlığına olumsuz etkileri üzerine yaptıkları çalışmalarda (E123) amaranthın 250 mg/kg dozunda çekumda genişleme ve pelvik kalsifikasyon hiperplazisine sebep olduğu belirlenmiştir (Erden Çalışır ve Çalışkan, 2003). Gıda renklendiricilerinin immünotoksik etkisini belirlemek amacıyla deneyler yapılmıştır. Elde edilen bulgular, amaranthın toksik olmadığı düşünülen dozlarının bile insanlarda bağışıklık sistemini baskılayarak, sorunlar oluşturduğunu göstermiştir (Koutsogeorgopoulou vd., 1998).

Genotoksisite; hücre çekirdeği, DNA ve kromozomların yapısında meydana gelen değişiklikleri, DNA kırılmalarını, mutasyonları ve kromozom anomalileri gibi gen defektlerini içeren çok kapsamlı bir terimdir (Young, 2002). Genoma zarar veren toksik ajanların çeşitli mutasyonlara sebep olarak DNA'da hasar meydana getirmesi ise genotoksik etki olarak tanımlanmaktadır (Choy, 2001; Mortelmans ve Rupa, 2004; Zeiger, 2004). Genotoksik bir maddenin, DNA ile doğrudan veya metabolik aktivasyondan sonra etkileşerek DNA molekülünün yapısına ve/veya işlevine zarar verdiği ve DNA hasarı meydana geldiğinde hücrenin hücre döngüsünü kesintiye uğrattığı bilinmektedir. DNA onarımı başarılı olursa hücre döngüsü devam etmektedir. Ancak başarısız olursa hücrede yaşlanma, apoptoz veya mutasyon gelişerek kanserojeneze neden olabilmektedir (Weisburger, 1999). Kimyasal bir ajanla maruziyet sonrası toksisite gelişimi; hedef molekül ile etkileşimi takiben, ilk olarak anormal hücre sinyali ve yetersiz hücre bakımının aracılık ettiği hücresel işlev bozukluğu oluşturacak toksik maddenin hedef dokuya verilmesini içermektedir. İşlem, toksik maddenin kendisini veya ana bileşikten daha reaktif olabilen metabolizma ürününü kapsamaktadır. Hasarlı hücreler ölebilir veya homeostazı onarmaya, iyileştirmeye ve eski haline getirmeye çalışabilir. Onarmaya ve iyileşmeye çalışan hücreler, onarım ve iyileşme başarısız olursa apoptoza girme eğilimindedir. Hayatta kalan ve çoğalmaya

devam eden hasarlı hücreler ise karsinojenez dahil olmak üzere olumsuz sonuçların meydana gelmesine sebebiyet vermektedir (Choudhuri vd., 2018). Toksik bir ajanla temas sonrası gelişen toksisite oluşum basamakları Şekil 1.1’de gösterilmiştir.



Şekil 1.1. Toksik ajanla temas sonrası oluşan toksisitenin oluşum basamakları (Choudhuri vd., 2018)

Genotoksisite testleri, organizmaların normal yaşamları esnasında çeşitli toksik etkenlere maruz kalmaları sonucunda oluşan, genetik anormalliklerin incelenmesinde ve çeşitli nedenlerle ortaya çıkan DNA hasarının belirlenmesinde önemlidir (Kirsch vd., 2003). Genotoksisite testleri en basit anlamıyla genoma zarar veren ajanların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu testler 1970 yılından beri kimyasalların güvenilir olup olmadığının değerlendirilmesi aşamasında en temel nokta olarak görülmektedir (Zeiger, 2010). Genotoksisite ve kanser oluşumu arasındaki ilişki birçok araştırmada incelenmiş ve insanlar için kanserojen olan maddelerin büyük çoğunluğunun aynı

zamanda genotoksik olduğu belirlenmiştir (Zeiger, 1998; Choy, 2001). Genotoksik etkiye sebep olan maddeler genomda hasar oluşturduğundan DNA ifadesini direkt olarak ya da dolaylı yollardan etkileyerek genetik kararlılığın bozulmasına neden olmaktadır (Zeiger, 2004).

Çalışmamızda moleküler markır yöntemlerinden olan ISSR-PCR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) tekniği ve IRAP (Retrotranspozonlar Arası oğaltım Polimorfizmi) tekniği kullanılarak, amaranth gıda boyasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksik etkilerin belirlenmesi hedeflenmiştir. IRAP yöntemi, retrotranspozon temellidir ve çalışma prensibi herhangi bir restriksiyon enzimine veya ligasyon aşamasına ihtiyaç duymaksızın PCR aracılığıyla polimorfizmin belirlenmesine dayanmaktadır (Schulman ve Kalendar, 2005). ISSR yöntemi de IRAP gibi PCR tabanlı bir yöntemdir. Bu tekniğin prensibi ikili, üçlü, dörtlü ve beşli tekrarları olan nükleotit primerleri kullanılarak iki mikrosatellit arası bölgenin kopyalanmasıdır (Zietkiewicz vd., 1994; ElWahabi ve Bukhari, 2014). Her iki yöntemde de PCR ürünlerinin UV altında incelenen jel görüntüsünde bant sayısı ve yoğunluğuunda ki değişimler, meydana gelen genetik değişikliklerin belirlenmesini sağlamaktadır (Becerril vd., 2001).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Amaranth Gıda Boyasıyla Yapılmış Çalışmalar

Clode ve arkadaşları (1987); dişi ve erkek sıçandan oluşan gruplara ortalama 112 hafta boyunca 50, 250 ve 1.250 mg/kg/gün'lük dozlarda amaranth içeren besin vermiştir. Amaranthın doğurganlık ve tümör insidansı üzerinde hiçbir olumsuz etkisi gözlenmemiştir. Yüksek doz grubundaki sıçanların daha fazla yavru ürettiği ve ortalama yavru ağırlığının kontrollerden daha düşük olduğu saptanmıştır. En yüksek doz uygulanan her iki cinsiyette de 250 mg/kg/gün verilen erkeklerde artmış çekum ağırlığı, yüksek doz dişiler de ise 18 ay sonra idrarda daha fazla protein atılımı olduğu gözlenmiştir. Diyetle 50 ve 250 mg/kg/gün konsantrasyonlarında verilen amaranthın herhangi bir kanserojen etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak 1.250 mg/kg/gün dozda amaranthın dişilerin böbrekleri üzerindeki olumsuz etkisinden dolayı toksisite düzeyi tespit edilememiştir.

Radwan ve arkadaşları (2010); erkek albino sıçanlar kullanılarak iki dönem (7 ve 21 gün) boyunca 50 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozunda sentetik renklendirici ajan amaranthın günlük uygulamasının (peritoneal enjeksiyon) etkisini incelemiştir. Çalışma boyunca büyüme, hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri gözlenmiştir. Sonuçta, amaranth maruziyetinin, kontrol ile karşılaştırıldığında belirgin değişikliklere neden olduğu anlaşılmıştır. Vücut ağırlığı değişim yüzdesinde, RBC sayımında, Hb konsantrasyonunda ve HCT değerinde önemli bir düşüş gösterirken, amaranth uygulanan sıçanlarda serum üre ve kreatinin seviyelerine ek olarak WBC'lerde, AST ve ALP'nin serum aktivitesinde önemli bir artış olduğu saptanmıştır.

Bateman ve arkadaşları (2004); sentetik gıda boyaları ve koruyucuların 3 yaş grubundaki çocuklar üzerinde hiperaktif davranışa yol açıp açmadığını belirlemek amacıyla bir deney yapmışlardır. Araştırma için bu katkı maddeleri, 3 yaş grubunda yer alan çocuklara oral yolla verilmiştir. Çocuklara ilk başta 7 gün boyunca yapay gıda boyası ve koruyucu içermeyen bir beslenme planı uygulanmış ve sonrasında 21 günlük süreçte rastgele belirlenen grupların her birine günlük 20 mg sentetik boya karışımı, 45 mg koruyucu (sodyum benzoat) ve her ikisinin de bulundurmaya karışım verilmiştir. Sonuçta, katkı maddelerinin çocukların diyetinden arındırılmasının hiperaktif

davranışlarda anlamlı bir düşüşe sebep olduğunu, bu katkıların diyetle alınmasının ise anlamlı bir artışa sebep olduğunu belirtmişlerdir. Tüm bunlara ek olarak sentetik boya ve koruyucu içeren besinlerin çocuklara verilmemesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Semerdoğan'ın (2012); *Drosophila melanogaster*'in Oregon (R) yabanıl ve vestigial mutant soylarında larva dönemindeki ölüm ve yaşam süresi üzerine bazı azo boyaların etkilerinin incelendiği tez çalışmasında azo boyalardan Sunset Yellow, Tartrazin, Ponceu 4R, amaranthın *Drosophila melanogaster*'in iki farklı soyuna ait 72 saatlik larvalarda gelişen toksisite düzeyleri araştırılmıştır. Ayrıca bu azo boyalarla oluşturulan diyetle bağlı olarak her iki soyun ergin bireylerinde yaşam süreleri de hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular, azo boyaların toksisite seviyelerinin, tartrazin > amaranth > sunset yellow $\geq$ ponceu 4R şeklinde olduğunu göstermiştir.

Sarıkaya ve arkadaşlarının (2010) çalışmasında, eritrosin, patent blue, indigokarmin, karminik asit ve amaranth gıda boyalarının toksik olduğu düşünülen çeşitli konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Drosophila melanogaster* (*mwh* x *flr*)'nin ömür uzunluğu üzerine etkisi araştırılmıştır. İki işaret geni taşıyan üç günlük larvalar çeşitli dozlarda gıda boyası barındıran *Drosophila* normal besi yeri ile beslenmiştir. Kullanılan gıda boyaları için yaşama yüzdeleri araştırılmıştır. Bu çalışma ile gıda renklendiricilerinin letal etki gösteren konsantrasyonları belirlenmiştir. Bu konsantrasyon amaranth için 100 mg/ml olduğu saptanmıştır. Ayrıca gıda renklendiricileri toksik etki düzeylerine göre eritrosin, indigokarmin, patent blue, amaranth, karminik asit şeklinde sıralanmıştır.

Saccharomyces cerevisiae maya suşlarının 9,76 ile 5000 $\mu\text{g/mL}$ amaranth boya çözeltilerine maruz bırakıldığı bir deneyden elde edilen bulguların analizi sonucunda, boyanın 1.250 $\mu\text{g/mL}$ 'sine eşit veya daha yüksek konsantrasyonları içeren solüsyonlarında maya suşlarında genotoksisite meydana getirdiği raporlanmıştır (Weisburger, 1999).

Yemiş'in (2020) tez çalışmasında, *Vicia faba* (bakla) bitkisinin amaranthın 30, 50, 70, 100, 250 ve 500 mg/L dozlarına maruz bırakılması sonucunda elde edilen veriler incelenmiştir. Amaranthın çimlenmeye etki etmediği ancak 250 ve 500 mg/L dozlarının

uygulandığı bitkilerde kök gelişiminde sorunlar oluştuğu, mitotik indeks ve mitotik anormallik açısından ise; tüm dozlarda genotoksik etki meydana geldiği belirtilmiştir.

Sasaki ve arkadaşları (2002), içlerinde gıda boyalarında yer aldığı 39 adet sentetik katkı maddesini deney farelerine ağız yoluyla aktarmıştır. Bu katkı maddelerine maruz bırakılan farelerin mide, kolon, böbrek, karaciğer, mesane, kemik iliği, akciğer ve beyin dokuları üzerinde comet testi çalışılarak bu maddelerin genotoksik etkileri belirlenmiştir. Tüm katkı maddeleri arasında en yüksek genotoksitenin gıda boyalarında gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Amaranth, rose bengal, tartrazin, eritrosin, allura red, new coccin ve floksin gıda renklendiricilerinin mide, mesane ve kolon hücrelerinde doz artışıyla doğru orantılı olarak DNA bozulmalarına neden oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca bu boyaların düşük konsantrasyonlarının da sindirim organlarında DNA bozulmalarını arttırdığı belirlenmiştir.

Hong ve arkadaşlarının (2007) çalışmasında; *Shewanella decolorationis* kullanılarak Ames testi ile amaranthın mutajenik potansiyele sahip olduğu ancak sitotoksik potansiyele sahip olmadığı gösterilmiştir. Önceki çalışmalar azo boyaların genellikle toksik olmadığını bildirmiştir (Brown ve DeVito, 1993; Chung ve Cerniglia, 1992), ancak bu çalışmadaki sonuçlar azo boya amaranthın güçlü mutajenik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Jiang ve arkadaşları (2020) deneylerinde; 4 azo boyası tartrazin, Sunset Yellow, amaranth ve Allura red kullanılarak zebra balığı embriyolarında oluşan gelişimsel toksitenin değerlendirilmesi amaçlamıştır. Deneysel sonuçlar göstermiştir ki 5 ile 50 mM aralığındaki konsantrasyonlarla müdahale edilen azo boyaların etkisi, zebra balıklarında yumurtadan çıkma zorluğu, kalp ödemi, düşük kalp hızı, yolk kesesi ödemi, spinal eğrilik, kuyruk distorsiyonu ve spinal defektler gibi gelişimsel anormallikler şeklinde kendini göstermiştir. Her bir azo boyanın 100 mM'lık maruziyetinin tamamen embriyoletal sonuçlar doğurduğu raporlanmıştır.

Zhang ve Ma (2013); amaranthın insan serum albümini (HSA) ile etkileşimini mekanik ve konformasyonel deneylerle araştırmıştır. Bulgular, amaranthın HSA'ya bağlanmasının, hidrojen bağlama ağlarındaki bozukluğu temsil eden HSA'nın konformasyonel değişikliğine neden olduğunu göstermiştir. Sonuçta amaranthın insan

hemoglobininin (Hb) floresanını verimli bir şekilde söndürdüğü belirtilmiştir. Bu analiz verileri amaranthın insan serum albumini ve hemglobin yapısında bozulmalar meydana getirdiğini açıkça ortaya koymuştur.

Koutsogeorgopoulou ve arkadaşlarının (1998) yapmış olduğu çalışmada; amaranth ve tartrazin gibi gıda renklendiricilerinin sitotoksik ve immünosupresif etkilerini belirlemek amacıyla insan lenfositleri üzerinde bir deney gerçekleştirilmiştir. Bu maddelerin geniş konsantrasyon aralıklarında sitotoksik etkileri, kolorimetrik in vitro sitotoksisite deneyleri, nötr kırmızı alım (NR) ve tiazolil mavi tetrazolyum bromür (MTT) ile insan lenfositleri üzerinde incelenmiştir. Sonuçta, test edilen her iki maddeninde net bir biçimde immünosüpresif etkiler gösterdiği saptanmıştır.

2.2. IRAP Yöntemi ile Yapılmış Genetik ve Epigenetik Çalışmalar

Yetgin'in (2019) çalışmasında; farklı dozlarda bor konsantrasyonu uygulanarak yetiştirilen Türk Kır çeltiği ve Bafra Yıldızı çeltik çeşitlerinde meydana gelen genotoksisite, IRAP moleküler marker tekniği kullanılarak incelenmiştir. Kır çeltiği örneklerinde Bafra Yıldızı örneklerine göre daha fazla sayıda polimorfik bant gözlenmiştir. Deneyde düşük bor konsantrasyonu altında yetiştirilen Kır çeltiği örneklerinin çoğunda az sayıda bant izlenirken, yüksek konsantrasyonla muamele edilen örneklerde ise daha çok sayıda bant oluştuğu raporlanmıştır. Farklı bor konsantrasyonu altında yetiştirilen çeltik örneklerinde gözlenen fizyolojik değişimlerin sebebinin retrotranspozon hareketlerinden kaynaklanabileceği belirtilmiştir.

Yiğider (2016); mısır tohumlarını toksik olduğu düşünülen 4 çeşit ağır metale maruz bırakıp, sonrasında test edilen GTS (Genomik Kararlılık Sabitliği) değeri ve gelişen retrotranspozon polimorfizmi üzerine humik asitin etkisini incelemiştir. Genotoksik etkiyi belirlemek amacıyla araştırmada IRAP, REMAP (Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltma Polimorfizmi) ve ISSR tekniği kullanılmıştır. Sonuçta ağır metallerin tüm konsantrasyonlarının retrotranspozon polimorfizmini arttırdığı ve DNA harabiyeti oluşturarak GTS oranında da düşüşe sebep olduğu belirtilmiştir. Kullanılan ağır metallerin toksik etkilerinin uygulanan humik asit etkisiyle azaldığı bildirilmiştir.

Akgün'ün (2018) çalışmasında buğdaya (*Triticum aestivum*) çeşitli dozlarda UV-C ile 14 gün süreyle müdahale edilerek stres oluşturulmuştur. Genetik analizler için RAPD, CRED-RA (Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification) ve IRAP uygulanarak toplam 27 primer ile PCR yapılmıştır. Deney sonucunda uygulanan UV dozu arttıkça % polimorfizm oranı artarken, % GTS değerinin düştüğü ve stresin DNA'da hipermetilasyona sebep olduğu bildirilmiştir.

Turhan'ın (2016) çalışmasında *Triticum aestivum* (kırık buğday) çeşidinde IRAP ve REMAP markırları kullanılarak retrotranspozon kaynaklı polimorfizm üzerine selenyum ve PEG 8000 ile oluşturulan kuraklık stresinin etkileri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda kuraklık stresi retrotranspozon polimorfizminde artışa GTS oranında ise azalışa neden olmuştur. Bu sonuçlara göre selenyumun kuraklık etmenine karşı olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir.

Dilmen (2017), tuzluluğa hassas olan bir ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşiti kullanılarak NaCl ile oluşturulan tuzluluk stresinde, salisilik asit uygulamasının buğdayda genomik stabilite ve LTR retrotranspozon polimorfizmi üzerine olan etkisini incelemiştir. Uygulamada 5 IRAP primeri (N-57 Nikita, Stowaway, Sukkula, BARE-1 ve E-2647 Nikita) ve retrotranspozona dayalı yöntem olan REMAP tekniğinde ISSR (UBC 811, UBC 826, 8081, 8082) primerleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda tuzluluğun oluşan bant profillerinde polimorfizm artışına ve GTS değerinde azalışa neden olduğu, tuzluluk stresinde uygulanan salisilik asit uygulamasının ise retrotranspozon polimorfizminde azalışa ve aynı zamanda GTS oranında artışa neden olduğu belirlenmiştir.

Şahin ve arkadaşları (2020), farklı dozlarda artan tuz stresi koşulları altında 14 gün boyunca yetiştirilen GD'lu (Genetiği değiştirilmiş) ve GD'lu olmayan soya fasulyelerini kullanarak, SIRE1, Bagy2 ve Nikita primerleri ile IRAP PCR yöntemi uygulamıştır. Tuzluluğun, kontrole kıyasla bitkide gövde ve kök uzunluğu ile yaprak alanının azalmasına sebep olduğu bildirilmiştir. Sonuçta tuzluluğun soya fasulyesi ve GD'lu soya fasulyesini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir.

Yılmaz ve arkadaşlarının (2018) araştırmasında; bitki örnekleri kontrol (Herbisit muamelesi yapılmamış), %1 ve %2 herbisit uygulanmış olmak üzere 3 gruba

ayrılmıştır. Herbisitlerin pirinçte bulunan retrotranspozon aktiviteleri üzerindeki etkileri IRAP PCR tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Retrotranspozon aktiviteleri, bitki örnekleri arasında polimorfizm oranlarının %8 - %90 arasında değiştiğini göstermiştir. Bu değişken oranların istatistiksel olarak anlamlı olduğu, herbisitlerin retrotranspozon aktivitelerini arttırdığı ve DNA mutasyonlarından sorumlu olduğu değerlendirilmiştir.

Çakmak Güner'in (2018) çalışmasında, bitkilere özgü olan (Nikita, Sukkula, SIRE1 ve BAGY2) retrotranspozonları ile HERV-K6 ve HERV-K11 endojen retrovirüslerinin insan genomunda bulunduğu, IRAP yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Deneyde 24 bireyden alınan kanlardan izole edilen DNA'lar ile IRAP primerleri kullanılarak, PCR gerçekleştirilmiştir. Araştırmada bitkilerde bulunan Nikita, Sukkula, SIRE1 ve BAGY2 retrotranspozonlarının insan genomunda gözlemlendiği ve genomda polimorfizme sebep olabildikleri gösterilmiştir.

Kepekçi ve arkadaşları (2019), HERV polimorfizmleri ile nazal polip oluşma riski arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla 16 hastadan alınan nazal sürüntü örneklerini HERV-K6, HERV-K11, HERV-L1, HERV-L2 primerleri kullanılarak, IRAP PCR yöntemiyle analiz etmiştir. Çalışma sonucunda polimorfizm tespit edilmemiştir. Ancak IRAP yönteminin insan nazal sürüntü örneklerinde kullanılabilir olduğu bildirilmiştir.

2.3. ISSR Yöntemi ile Yapılmış Genetik ve Epigenetik Çalışmalar

Alkaya'nın (2021) çalışmasında, tekstil sektöründe önemli bir yeri olan RR195 (reaktif red 195) boyasının altı farklı dozları *A. cepa* kök hücrelerine 24, 48 ve 72 saatlik sürelerle uygulanmıştır. Bu giysi boyasının genotoksitesisi ISSR ve RAPD-PCR kullanılarak karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Araştırma sonucunda reaktif red 195 boyasının doz artışının ve maruziyet süresinin uzamasına bağlı olarak genotoksisite ve sitotoksitenin arttığı bildirilmiştir.

Bir araştırmada, kadmiyum ve kurşunun genotoksik etkisi, ISSR moleküler belirteçleri ile *Sphagnum palustre* yosununda incelenmiştir. 12 primer ile toplam 169 tekrarlanabilir bant elde edilmiş, bunların on tanesi polimorfizm (yeni bant oluşumu/kaybolması) göstermiştir. Sonuçta her iki metalin de doz artışıyla orantılı olarak GTS değerinde bir

azalmaya neden olduğu ve buna bağlı olarak metaller tarafından indüklenen bir genotoksik etki oluşturduğu saptanmıştır (Sorrentino vd., 2017).

Şenel'in (2019) çalışmasında; sucul olan bir bitki türünün akvaryumuna ağır metal karışımının farklı dozlarını ekleyerek bitkiyi ağır metallere maruz bırakmıştır. Bu ağır metallerin bitkide oluşturduğu genotoksik etkiler ISSR yöntemi ve beraberinde diğer moleküler yöntemler de kullanılarak test edilmiştir. Deneyin sonuçlarına göre; sucul olan bitkiye uygulanan ağır metal karışımının dozu arttıkça bitkinin tüm kök, gövde ve yaprakları üzerinde gen hasarlarının artarak meydana geldiği değerlendirilmiştir.

Kurşun (Pb) tarafından indüklenen *Pistia stratiotes* bitkilerindeki DNA değişikliklerinin değerlendirilmesi ilgili bir çalışmada bitkilere farklı konsantrasyonlarda kurşun içeren su ile muamele edilmiştir. ISSR PCR uygulaması sonrasında genetik yapı değişiklikleri ve indüklenen Pb konsantrasyon seviyeleri arasındaki korelasyonu ortaya çıkarmak için GTS değeri belirlenmiştir. Sonuçlar, sudaki ortalama kurşun miktarı ve uygulama süresi artırıldıkça DNA hasarının arttığını ortaya koymuştur.(Neeratanaphan vd., 2014)

Neeratanaphan ve arkadaşları (2020); katı atık rezervuarında ağır metallere 4 ay süreyle maruz kalmış, hibrit yayın balığının solungaç ve karaciğerlerinden ekstrakte edilen DNA'lar ile 25 adet ISSR primeri kullanarak çalışmıştır. Sonuçta iyi kalitede DNA bantları elde edilmiş ve kontrol grubuna göre toplamda 188 farklı bant oluşmuştur. Toksik dozun artışıyla bağlantılı olarak kontrol grubuna kıyasla daha fazla polimorfik bant geliştiği ve sonuçta genotoksikite riskinin arttığı tespit edilmiştir.

İltihaplanma kaynaklı mutasyona uğramış hücre gruplarının çoğalarak kanserin en erken aşamalarını nasıl başlattığını araştırmak için bir insan tümörijeniz dokusu ile AP PCR (isteğe bağlı olarak hazırlanmış PCR) ve ISSR PCR yöntemleri kullanılarak çalışılmıştır. Her iki teknikte, hedef DNA'daki mutasyonların/değişikliklerin değerlendirilmesine izin vererek normal dokudan (kontrol) gelen DNA dizilerinin, hedef dokudan gelen dizilerle karşılaştırması yapılabilmektedir. Tümörijeniz dokusunun AP PCR ve ISSR PCR ile elde edilen DNA'larda bant kazanımlarının (yeni bantın görünümü ve bant yoğunluğunun kazanımı dahil) ve bant kayıplarının (bant yoğunluğunun azalması ve bantın tamamen kaybolması dahil) tespiti, bir DNA

segmentinin silindiğini veya eklendiğini, alelik kazançları veya kayıplarının oluştuğunu, bu da genomik kararsızlığın varlığını net olarak göstermiştir (Chen vd., 2005).

Mishra ve arkadaşları (2009); Kültürlenmiş insan kolon epitelyal-FHC hücrelerinin metil izosiyanata karşı toksik tepkisini araştırdıkları bir çalışmada DNA hasar sinyal faktörlerinin fosforilasyon seviyesinin kalitatif ve kantitatif açıdan kontrollere kıyasla arttığını saptamıştır. Aynı zamanda, bu hücrelerin yüksek apoptotik indekse ve artan inflamatuvar sitokin seviyelerine sahip olduğu, ISSR PCR tekniği ile yapılan analizde, mikro uydu kararsızlığının arttığı anlaşılmıştır. Sonuçlar, izosiyanatların kolonositlerde genomik kararsızlığa neden olabileceğini göstermiştir.

Anderson ve arkadaşlarının (2001) “İnsan Sporadik Kolorektal Kanserde İntrakromozomal Genomik Kararsızlık” konulu çalışmasında, cerrahi rezeksiyon yapılan hastalardan elde edilen kanserli dokudan ve kontrol grubu olarak, sağlıklı dokulardan izole edilen DNA’lara ISSR PCR yöntemi uygulanmıştır. Kanserli doku ile normal doku karşılaştırıldığında, normal olan dokuda bir bantın eksik olduğu belirlenmiştir. Bu bantın klonlanması ve sekanslanması sonucunda kimliği ortaya çıkarılarak, tümöre özgü olarak olduğu ve 13. kromozom üzerinde yer aldığı tespit edilmiştir. ISSR tekniği insan kolorektal tümörlerinde genomik kararsızlığın tahmin edilmesini sağlamış, bununla birlikte, genomik olayların nerede meydana geldiğini de kolayca ortaya çıkarmıştır.

Alayeb’in (2021) araştırmasında plastik fabrikasında çalışan işçilerin sağlık sorunlarının ve genetik mutasyonların nedenlerinin ortaya çıkarılması amacıyla farklı sürelerde plastik buhara maruz kalan işçiler ve kontrol (plastik buhara maruz bırakılmamış) grubu gönüllülerden alınan kanlardan izole edilen DNA’lara ISSR ve RAPD yöntemi uygulanmıştır. Sonuçlar, kontrol grubu ile plastik buhara maruz kalan grup arasında ki bant profillerinde birkaç farklılık olduğunu göstermiştir. Bantlama modellerindeki bu değişiklikler, genomik DNA’da bir modifikasyonun gerçekleştiğini ve genotoksik etki oluştuğunu düşündürmüştür.

3. KURAMSAL TEMELLER

3.1. Gıda Katkı Maddeleri

Gıda katkı maddeleri, normalde tek başına gıda kategorisine girmeyen ve gıdanın tipik bir parçası gibi görülmeyen, ancak çeşitli amaçlarla gıdaya eklenen herhangi bir madde olarak tanımlanmaktadır. Gıda katkı maddelerinin kullanıldığı gıdaların imalatı, işlenmesi, hazırlanması, paketlenmesi, taşınması esnasında gıdanın başka bir bileşen haline gelmesine ya da farklı değişikliklere (doğrudan veya dolaylı olarak) sebep olması makul olarak beklenebilir bir durumdur (Swaroop, 2011).

Gıda katkı maddeleri, içeriğinde bulunduğunu bilmeden tükettiğimiz birçok gıda türünde bulunmaktadır. Bu nedenle gıda boyası kullanımının biyolojik sonuçlarını incelemek çok önemlidir. Ayrıca, diyet ve sağlık arasında iyi bilinen ilişki ve insanların yaşam kaliteleri hakkında artan farkındalıkları nedeniyle, hangi boyaların sağlığa zararlı olabileceğini bilmek tüketiciler için önemini korumaktadır. Gıda katkı maddelerinin çocukluk hiperaktivitesini arttırdığı, ürtiker, astım, alerji ve rinit gibi bazı rahatsızlıklara sebep olduğu konusunda bir çok çalışma yapılmıştır (Juhlin, vd., 1972).

3.2. Gıda Katkı Maddelerinin Sınıflandırılması

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde yer alan ortalama üç yüz tane gıda katkı maddesi, farklı amaçlarla gıda sanayisinde kullanılmaktadır. Gıda katkı maddeleri (GKM) “E” kodu ile sınıflandırılmaktadır. GKM temel fonksiyonuna göre; Renklendiriciler; E100-180 Koruyucular; E200-297, Antioksidanlar; E300-321, Emülsifiye ve Stabilizatörler; E322-500, Asit-Baz Sağlayıcılar; E500-578, Tatlandırıcılar, Koku Verenler; E620-637, Geniş Amaçlı GKM; E900-927 şeklinde sınıflandırılmıştır (Susever, 2019). GKM kullanım amaçlarına göre ise 4 gruba ayrılmıştır (Yurttagün, 2010).

3.2.1. Koruyucular

Antimikrobikler; gıdaların bozulmasını önleyerek uzun süre raflarda kalmasını sağlamak, gıdanın orjinal rengini ve tadını korumak amacıyla kullanılmaktadır. Nitrit ve nitratlar, en çok tartışma yaratan antimikrobikler arasında yer almaktadır (Yurttagün, 2010).

Antioksidanlar; gıdalarda istenmeyen, tat değışikliği, kötü koku, acımtırak tat (oksidatif asidite) oluşumunu engellemek, renk kaybını önlemek amacıyla çoğunlukla yağlarda ve yağlı besinlerde kullanılmaktadır (Yurttagün, 2010).

3.2.2. Yapıyı hazırlama ve pişme özelliğini geliştirenler

- pH ayarlayanlar; gıdanın pH miktarını stabilize etmek amacıyla gıdaya eklenmektedirler (Yurttagün, 2010).
- Topaklanmayı önleyenler; toz halindeki bulunan besinlerin akışkanlığını sağlayarak topaklanmayı engellemektedirler. Bu grupta en çok tercih edilenler trikalsiyum fosfat ile alüminyum silikattır (Yurttagün, 2010).
- Emülsifiyerler; yağ ile suyu karıştırarak gıdanın her yerine eşit dağılım olmasını sağlamaktadırlar (lesitin, mono ve digliseritler).
- Stabilizörler; su ve yağın birlikte kalmasını sağlamaktadır.
- Jelleştirme maddesi; gıdada jelimsi kıvam oluşturmaktadırlar. Pektin ve keçiyoynuzu zımkı, bu amaçla kullanılmaktadır.
- Yapay tatlandırıcılar; tatlımsı tadı kalorisiz olmadan gıdaya vermek amacıyla kullanılmaktadır. Aspartam ve sakkarin bu grupta yer almaktadır (Yurttagün, 2010).
- Renk stabilizasyon ajanı; gıdanın renginin kalıcılığının devam etmesini sağlamaktadır. Kabartma ajanı gaz oluşturarak hamurun kabarmasını sağlamaktadır. Un işleme ajanı; unun daha iyi pişmesini sağlamaktadır (Yurttagün, 2010).

3.2.3. Besin değeriini koruyucu ve geliştirenler

İşleme sırasında kaybolan besin öğelerini yerine koymak (B1, B2, niasin) ve diyetle eksik olabilecek besin öğelerini eklemek (A, D vitaminleri) amacıyla kullanılmaktadır.

3.2.4. Aroma vericiler ve renklendiriciler

Aroma artırıcılar eklendikleri gıdalarda koku ve tadı daha aromatik hale getirmek yada gıdanın doğal özelliklerini korumak, değıştirmek, güzelleştirmek amacıyla kullanılmaktadır.

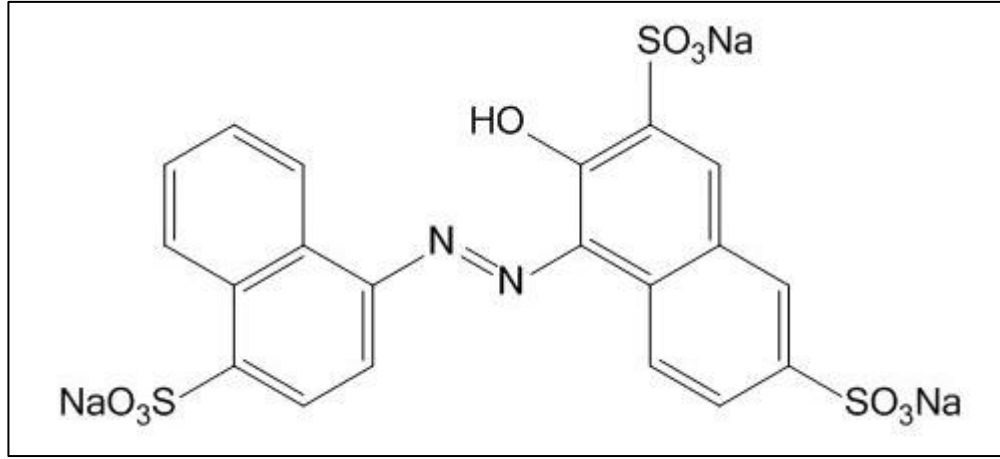
Gıda renkleri, tüketilen gıdaların daha taze ve çekici görünmesi için önemlidir. Bu nedenle renklendiriciler, gıdalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Yurttagün, 2010). Gıda renklendiricileri doğal ve yapay olarak ikiye ayrılır. Doğal gıda boyaları genellikle bitkiler, mantarlar ve böcekler gibi türlerden elde edilmektedir. Yapay gıda boyaları ise sentetiktir, ucuzdur. pH, sıcaklık ve ışığa karşı daha dayanıklı oldukları için tercih edilmektedir. Bununla birlikte, birçok sentetik boya insan sağlığına zararlıdır ve çoğu yönetmeliklerle sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Azo boyaların yaklaşık %65'i gıdalarda renklendirici olarak kullanılmaktadır (Soylak, 2022).

3.2.4.1. Azo boyalar

Azo boyalar, yapısında azo gubu ($-N=N-$) ile aromatik halka bulunduran yapay katkı maddeleri olarak kullanılmaktadır (Yamjala, 2016). Bu renklendiriciler asidik azo boyalar ve bazik azo boyalar olarak iki gruba ayrılmaktadır. Gıdalarda kullanılan sentetik boyaların yarısından fazlası azo boyalardan oluşmaktadır ve piyasada yaklaşık olarak 3000 kadar azo boya mevcuttur. Amaranth, Sunset Yellow, Tartrazin, Allura Red ve Carmoisine'nin en çok tercih edilen renklendiriciler olduğu bilinmektedir (Magesa vd., 2019).

3.2.4.2. Amaranth gıda boyası

Amaranth gıda boyası; amaranth bitkisinin çeşitli renklere sahip çiçeklerinden elde edilen, morumsu kırmızı renkte, toz halinde, suda, etanolde çözünen ancak bitkisel yağda çözünmeyen bir azo boyadır. Amaranthın diğer ticari adları C.I. Food Red 9 (CI Gıda Kırmızısı 9) ve Acid Red 27 (Asit Kırmızısı 27) olarak bilinmektedir. Kimyasal adı Trisodyum 2-hidroksi-1-(4-sülfonato-1-naftilazo) naftalin-3,6- disülfonattır. Kimyasal formülü $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$ ve molar kütlesi 604,473 g/mol'dür (Thomas ve Adegoke, 2015). Amaranth anyonik bir özellikte olup sulu çözeltisi 520 nm'de maksimum absorpsiyona sahiptir. Deriye uygulandığında tahriş oluşturmazken, göze sürüldüğünde ise az miktarda tahriş meydana getirmektedir (Yemiş, 2020). Amaranthın yapısal formülü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Amaranth yapısal formülü (Thomas ve Adegoke, 2015)

Amaranth, pastörizasyon işlemleri sırasında uygulanan sıcaklığa karşı dayanıklı olması sebebiyle süt ürünlerinde, asit özellikli ortamlara rağmen bozulmadan kalabilme özelliğinden dolayı konserve gıdalarda, yüksek çözünürlüklü yapısı nedeniyle toz içecekler, tatlılar, krema tozları, çorbalar ve soslarda tercih edilmektedir (Atlı, 2010).

3.3. Genetik Değişiklikler

Hücrelerin çekirdek, DNA ve kromozom yapısında meydana gelen değişiklikler genetik değişikliklerdir. Genetik değişiklikler, bir populasyon içerisindeki bireylerin DNA dizilerindeki farklılıklar olarak tanımlanmaktadır (Choy, 2001; Mortelmans ve Rupa, 2004; Zeiger, 2004). En önemli sebebinin ise mutasyon ve rekombinasyonlar olduğu bilinmektedir. Mutasyonlar, DNA dizilerinde meydana gelen kalıcı değişiklikler olarak adlandırılmakta ve DNA replikasyonu esnasında DNA tamir enzimleri tarafından giderilemeyen bir hatanın oluşması veya DNA'ya zarar veren fiziksel ve kimyasal ajanların tesiriyle gelişmektedirler. Mutasyonların organizmaya hiçbir etkisi olmadığı gibi, faydalı/zararlı etkileri olabilmektedir (Fletcher, 2013).

3.4. Epigenetik Değişiklikler

DNA dizilimini değiştirmeden gen ifadesini farklılaştıran değişimler epigenetik değişimler olarak adlandırılmaktadır (Madlung ve Comai, 2004). Epigenetik kelime anlamıyla “Bu güne kadar öğrenilen alışılmış genetiğin dışında olan” olarak tanımlanmaktadır. Histon metillenmesi, fosforillenmesi, asetillenmesi, ubiquitinlenmesi

ve DNA metillenmeleri en çok karşılaşılan epigenetik olaylar olarak izlenmektedir. Epigenetik olaylar, geri dönüşümlü olmalarına rağmen gelecekteki jenerasyona geçebilmektedir (Madlung ve Comai, 2004). DNA metillenmesi, adenin ya da sitozin bazlarından birine metil grubu katılması sonucunda oluşmaktadır. Metillenme mekanizması, prokaryotlarda restriksiyon enzimlerini genomu tanıtarak, genomu koruyucu bir faktör olarak rol almaktadır (Wilson, 1988). Ökaryot canlılarda ise, genomu transpozonlardan koruyarak gen sessizleştirilmesini sağlamaktadır. (Martienssen ve Colot, 2001). Kodlama alanlarına veya yakınındaki bölgelere yeni dizilerin eklenmesi, gen ekspresyonunu değiştirerek genomu yapısal ve işlevsel olarak yeniden yapılandıracak mutasyonlara neden olmaktadır (Mansour, 2007). Bilinen çoğu bitki retrotranspozonu optimal koşullarda büyüme ve gelişme boyunca inaktif durumda olmakla birlikte optimal durumun bozulmasıyla hareketli duruma geçmektedirler (Mansour, 2007). Retrotranspozonların epigenetik aktivitelerinin genlerin ifadesinde değişimler meydana getirdiği bazı araştırmalarda raporlanmıştır. Bu araştırmalar arasında yer alan *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda metillenme azaldıkça transpozon hareketliliğinin arttığı bildirilmiştir (Miura vd., 2001).

3.5. Transpozonlar

Transpozonlar, çok hücreli canlı genomlarının yaklaşık %85'ini oluşturan hareketli elementler olarak görülmektedir (Huang vd.,2012). Bu mobil elementler genomik varyasyon ve evrimde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca hareketli olduklarında oluşturdukları hasar nedeniyle genomik kararsızlık, infertilite ve kanser gibi hastalıklara sebep olmaktadır. Transpozonların bu etkileri, son dönemde yapılan çalışmalarda öneminin artmasını sağlamıştır (Belancio vd.,2008). Hareketli elementler transpozisyon mekanizmasına göre iki sınıfa ayrılmıştır: RNA (retrotranspozonlar) ya da DNA (DNA transpozonları). Retrotranspozonların transpozisyon mekanizması; kopyala ve yapıştır, DNA transpozonların ise kes ve yapıştır olarak isimlendirilmektedir (Finnegan, 1989). Retrotranspozonlar, LTR (Long Terminal Repeat - Uzun Uç Tekrar Dizileri) dizileri ile sınırlandırılırken; DNA transpozonlarının uç kısımlarında TIR (Terminal Inverted Repeat - Ters Çevrilmiş Tekrarlar) dizileri bulunmaktadır (Jiang vd., 2002).

3.5.1. Retrotranspozon

İnsan ve fare genomlarının %40'ından fazlasını oluşturan retrotranspozonlar, kendilerini bir “kopyala-yapıştır” mekanizmasına dayalı olan transkripsiyon ve ters transkripsiyon mekanizmasıyla çoğaltmaktadırlar (Waterston vd. , 2002). Ayrıca gen ekspresyonunu etkileyerek, mutasyonlar oluşturan, genomun büyümesini uyaran en önemli epigenetik değişimler olarak izlenmektedirler. Bilinen çoğu ökaryot retrotranspozonu optimal koşullarda büyüme ve gelişme boyunca inaktif durumda olmakla birlikte optimal durumun bozulmasıyla hareketli duruma geçmektedirler (Mansour, 2007). Retrotranspozonların epigenetik aktivitelerinin genlerin ifadesinde değişimler meydana getirdiği bazı araştırmalarda raporlanmıştır. Bu araştırmalar arasında yer alan *Arabidopsis thaliana* üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda metillenme azaldıkça transpozon hareketliliğinin arttığı bildirilmiştir (Miura vd., 2001).

3.5.2. DNA Transpozonu

DNA transpozonları, transpozisyon aracı olarak RNA'yı kullanmazlar. Bu genomda hareket eden DNA dizileri, kendilerini bulundukları kromozomal bölgeden kesip çıkararak hedef alınan bölgeye insersiyon yapmaktadırlar. DNA transpozonlarının bu şekilde yaptıkları yer değiştirme mekanizması, “kes-yapıştır” mekanizması olarak adlandırılmaktadır. DNA transpozonları genomda kes yapıştır mekanizması ile taşındığı için genomun okunuşunu değiştirmektedir. Bir gen bölgesinin ifadesi, transkripsiyon ve ardından gerçekleşen translasyon ile meydana geldiğinden, istenilen proteinin sentezlenememesi, sentezin yarıda kalması veya tamamen farklı protein ürününün oluşması ile genomda ifade değişikliği ortaya çıkmaktadır (Wicker vd., 2007; Huang vd., 2009).

3.6. Genotoksisite Testlerinde Kullanılan Yöntemler

3.6.1. Genotoksisite testlerinde kullanılan PCR temelli olmayan yöntemler

3.6.1.1. Ames testi (Bakteriyel Geri Mutasyon testi)

Ames testi, toksik ajanların mutasyonların oluşmasına sebep olan etkilerinin belirlenmesinde tercih edilen, doğru sonuç verdiği bir çok çalışmayla teyid edilmiş

bakteriyal bir test yöntemidir (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011; Föllmann vd., 2013). Bu yöntemde, *Salmonella Typhimurium* veya *E. coli* mutant suşları ile çalışılmaktadır (Yüzbaşıoğlu vd., 2014). Teknik temel olarak, histidin üretme yeteneğini yitirmiş mutant *Salmonella typhimurium* bakterisinin, tekrar mutasyon geçirmesiyle histidini üretebilen suşlarının oluşması esasına dayanmaktadır. Histidin yokluğunda üreyebilen koloniler sayılarak mutajenite değerlendirilmektedir (Mortelmans ve Zeiger, 2000; McCann vd., 1975). Ames testi mutajenik bir yöntemdir ve diğer mutajenik testler gibi sadece mutajenitenin test edilmesi için değil aynı zamanda kimyasalların antimutajenik ve antikarsinojenik etkilerinin değerlendirilmesinde tercih edilmektedir (Ikken vd., 1998). Bunların yanı sıra kolay uygulanabilmesi, çabuk netice vermesi ve düşük maliyetli olması gibi avantajlarından dolayı birçok laboratuvarında rahatlıkla kullanılmaktadır (Şekeroğlu ve Şekeroğlu 2011; Föllmann vd., 2013).

3.6.1.2. Comet testi (Tek Hücre Jel Elektrophorez yöntemi)

Comet testi, hem genetik materyalde oluşan hasarı ve hem de bu hasarın seviyesini, belirleyip genotoksik oluşumların ortaya çıkarılmasını sağlayan önemli bir yöntemdir. Comet testinin temel prensibi, genotoksik ve sitotoksik olduğu düşünülen maddelerin canlı hücrelerde oluşturduğu tahribatı, hücre çekirdeklerini teker teker gözlem yaparak araştırmaktır. Teknikte, canlı dokulardan elde edilen çekirdek içindeki genetik materyal ince hazırlanmış agaroz jele yerleştirilerek elektriksiz alanda yürütülmektedir. Sonuçta DNA’da tek zincir ve/veya çift zincir kırıklarının oluşması ile farklı ağırlık ve elektriksiz yüke sahip DNA molekülleri jel elektrophorezinde birbirinden farklı hızlarda göç etmektedir. Hasarın seviyesine göre dairesel şekilden kuyruklu yıldıza benzer bir görünüme geçen DNA molekülleri floresan mikroskopla incelenmektedir. Görüntüler “kuyruklu yıldız” şekline benzediği için bu yöntem kuyruklu yıldız anlamına gelen “comet” adı verilmiştir (Olive vd., 1990, Kocyigit vd., 2005).

3.6.1.3. Kromozom Anormallikleri (KA) testi

KA testi, toksik bileşenlerle tetiklenen çeşitli yapısal ve sayısal kromozomal anormalliklerin belirlenmesi amacıyla sıklıkla tercih edilen bir tekniktir. In vitro KA testi ile memeli hücre kültürlerinde, in vivo KA testi ile çoğunlukla kemik iliği

hücrelerinde kromozom anormalliği sıklığı incelenmektedir. Ayrıca in vivo KA testi, özellikle mutajenitenin tespitinde, türe ve dokuya göre değişen metabolik olaylar, farmakokinetik ve DNA tamir sistemleri gibi etkilerin analizinde imkan tanımaktadır (Choy, 2001; Preston vd., 1981; Evans, 1984; Preston vd., 1987). Bu test tekniği ile kültüre alınmış periferik kan lenfositlerindeki kromozomal anormallikler değerlendirilerek DNA'daki hasar tespiti yapılmaktadır. KA testi, öncelikle insan lenfositlerinin in vitro olarak çoğaltılması, bölünme sürecinin 70. saatinde kolşisin ya da benzer etkiye sahip ajanlarla müdahale edilerek hücre bölünmesinin metafaz evresinde durdurulması ve kromozomların kolayca gözlenebilmesi esasına dayanmaktadır (Çelik, 2003). İnsanlar üzerinde yapılan araştırmalar sonucunda, periferik lenfositlerde meydana gelen spontan kromozomal anomalilerin artışı ile kanser oluşması arasında bağlantı olduğu anlaşılmıştır (Bonassi vd., 2000; Çakmak, 2000). KA yöntemi genomda oluşan harabiyetin gözlenmesini sağlaması ve anormalliklerin değerlendirilmesinde uluslararası geçerli standartlara uygun bir teknik olarak kabul gördüğü için önemli bir tekniktir (Tucker ve Preston, 1996).

3.6.1.4. Kardeş Kromatit Değişimi (KKD) testi

KKD testi, kromatitler arasında homolog bölgelerin simetrik bir şekilde kırılıp yer değiştirmeleri sonucunda oluşmaktadır (Kontaş vd., 2011). KKD'ler ilk olarak 1958 yılında Taylor'ın *Vicia faba* ve *Bellenalia romana* bitkilerinin mitotik kromozomları üzerinde yaptığı incelemeler sırasında gözlemlenmiştir (Taylor 1958). KKD testi kromozomların 5-bromo-2-deoksiüridin (BrdU) varlığında iki mitoz evresi geçirmesi ile başlayıp BrdU miktarı yönüyle birbirinden farklılaşan kromozomların floresan ile ışınlanması, Giemsa ile boyanması ve oluşan renk değişimlerinin sayısına göre kromatitlerin değerlendirilmesiyle sonlanmaktadır (Latt vd., 1980; Albertini vd., 2000; Wilson III ve Thompson, 2007; Jain vd., 2018; Salawu vd., 2018). Kromozomlar mikroskopta incelendiğinde, sadece bir zinciri BrdU içeren kromatitler koyu görünürken, her iki zinciri de BrdU içeren kromatitler açık renkli görünmektedir. Bu değişikliğe uğramış kromatitlere sahip kromozomlara "harlequin kromozom" adı verilir. Mikroskopla yapılan incelemede harlequin kromozomlara rastlanması "kardeş kromatid değişimi=KKD" olduğunu göstermektedir (Perry and Wolff, 1974).

KKD testleri genotoksik etkisi olduğu varsayılan maddelerin araştırılmasında kullanılan sitogenetik uygulamalardandır. Kanser hastalıkları üzerinde yapılan çalışmalar, KKD sayısındaki artış ile kanser hastalığı arasında doğru orantı olduğunu göstermiştir (Kontaş, 2011).

3.6.1.5. Mikronükleus (MN) testi

Mikronükleuslar, hücre çoğalması sırasında anafaz evresinde asentrik kromozomların ya da kutuplara gidemeyen kromozomların parçalarından köken alan, ana çekirdeğin dışında kalan çekirdekler olarak tanımlanmaktadır. 1886 yılında Howell, anemik kedilerin eritrositlerini incelerken mikronükleus varlığını fark etmiştir. Sonrasında Jolly 1907’de yaptığı araştırmalarla MN varlığını destekleyici sonuçlar elde etmiştir. Bu iki bilim insanının katkıları nedeniyle mikronükleuslara “Howell-Jolly cisimcikleri” adı verilmiştir (Anwar vd., 1994). Mikronükleuslar, çoğunlukla mitotik iğdeki hatalardan, hücreyi kontrol görevi olan genlerde oluşan harabiyetten, kinetokor ya da kromozomal aberasyonlardan kaynaklanabilmektedir (Faqi, 2017; Kirsch-Volders ve Fenech, 2019). Mikronükleus testi, insan lenfosit hücrelerinde in vivo ve in vitro olarak kromozomal hasarı ölçmek için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Bolognesi ve Fenech, 2013; Kirsch-Volders vd., 2014).

3.6.1.6. Fare Lenfoma testi

Fare lenfoma testi, bileşiklerin taşıdıkları toksik risklerin araştırılması için çok yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır. Bu teknikte çoğunlukla timidin kinaz geni kullanılıp memeli hücrelerinde gen mutasyonu belirlenmektedir. Sonrasında heterozigot timidin kinaz geni bulunduran hücreler lenfoma örneklerinden alınıp kullanılmaktadır (Clements, 2000). Uygulanan genotoksik ajanların maruziyeti sonucunda timidin kinaz gen işlevini kaybeden mutasyonlu genler triflorotimidine direnç kazanırlar ve mutasyon geçirmemiş genler heterozigotlar arasından seçilmektedirler. Moleküler ve sitogenetik yöntemlerle yapılan çalışmalar fare lenfoma hücrelerinin nokta mutasyonlarını da içeren birçok mutasyonu tespit edebildiğini ortaya koymuştur (Clements, 2000; Moore vd., 2003). Ayrıca bu test sonucunda genotoksik olduğu belirlenen ajanların çoğunun aynı zamanda memelilerde kanserojen etkiye sahip

olduklarını belirlemişlerdir. Fakat bazı çalışmalarda bu test ile aynı sonucu vermeyen kanserojen ajanlarda vardır. Sonuç olarak, fare lenfoma testi ile kanserojen etki arasında tam olarak anlamlı bir bağ olmadığı tespit edilmiştir (Moore vd., 2003).

3.6.1.7. Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) İleri Mutasyon testi

HPRT test prensibi pürin bazının sentezinde önemli rol üstlenen HPRT enziminde mutasyona uğramış hücrelerin belirlenmesine dayanır. Toksik etkiye sahip olan 6-tioguanin bulunan ortamda mutasyona uğramış olan hücreler tespit edilip, koloni frekansı hesaplanarak test gerçekleştirilmektedir. HPRT testi, DNA baz çiftindeki değişiklikleri, delesyonları, inversiyonları ve heterolog kromozom rekombinasyonları gibi gen hasarlarının tespitlerinde önemli bir yöntemdir (Albertini, 2001).

3.6.1.8. Rodent Dominant Letalite testi

Rodent dominant letal testi ile embriyonik ya da fetal ölümlere sebebiyet veren dominant letal etkiler tespit edilmektedir. Kimyasal bir bileşiğe maruz bırakıldıktan sonra dominant letalitenin oluşması çalışılan test bileşiğinin araştırma yapılan türün eşey dokularını etkilediğini göstermektedir.

Bu test yöntemi çoğunlukla farelerle yapılır ama bazen sıçanlarda tercih edilebilmektedir. Bu test kullanılarak erkek bireyin üreme hücrelerinde ya da kısırlık sonrası zigotta, dominant letal (DL) mutasyonları tetikleyen ajanlar belirlenmektedir. Testlerin çoğunda erkek sıçanlar, test edilecek kimyasala maruz bırakılır. Fakat, yumurta fertilizasyonu ve embriyonik ölümlerin değerlendirilmesi gerektiğinde dişi sıçanlar test kimyasalına maruz bırakılır (OECD, 2015; Yüzbaşıoğlu vd., 2016).

3.6.1.9. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

SMART, toksik olduğu düşünülen ajanların mutajenik ve genotoksik etkilerinin anlaşılması amacıyla *Drosophila* ile çalışılan mutajenite testi olarak deneylerde kullanılmaktadır. SMART, delesyon, mitotik rekombinasyon, kararsız translokasyon, nokta mutasyonu, kromozom ayrılama ya da kaybı gibi kromozom aberasyonlarının saptanmasını sağlayan kolay, ucuz ve hassas bir yöntemdir (Graf, 1998).

3.6.2. Genotoksisite testlerinde kullanılan PCR temelli yöntemler

Moleküler belirteçler, belirli bir genin varlığını yüksek doğrulukla tahmin etmek ve farklı genetik geçmişlerdeki genleri verimli bir şekilde transfer etmek için bir tanı aracı olarak kullanılabilmektedir (Gupta vd., 2015). Moleküler belirteçler çevresel faktörlerden etkilenmeden genetik farklılıkları daha ayrıntılı şekilde gösterebildiği için diğer belirteçlere göre daha avantajlı olduğu düşünülmektedir. PCR (Polimerizasyon Zincir Reaksiyonu), hücre siklusunda gerçekleşen DNA'nın kendisini kopyalama olayının in vitro koşullarda meydana gelmesi ile gerçekleştirilmektedir (Büyükleyla, 2013). PCR'a dayalı moleküler markörler, etkili oldukları ve az miktarda DNA gerektirdiği için genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Baruah vd., 2019). PCR teknolojisi; klinik çalışmalarda, hastalıkların tanı veya yatkınlıklarının ortaya konmasında, adli tıp alanında olay yerinden alınan numunelerden DNA profillerinin oluşturulmasında, ilaç üretimi, genetik çeşitliliğin belirlenmesi, bitki genetik deneyleri çalışmalarında ve daha birçok alanda kullanılmaktadır (Klug ve Cummings, 2003).

PCR reaksiyonu temelde üç adımda gerçekleşmektedir.

- DNA örneğinin yüksek sıcaklıkta denatürasyonu,
- Primerlerin kendisini tamamlayan dizilerle bir araya gelmesi,
- Yapışmış primerlerin Taq polimeraz enzimi etkisiyle uzaması.

PCR'da yer alan bu basamaklar programlanan döngü sayısına göre tekrar eder ve her döngüde DNA ortalama iki katı seviyede çoğalmaktadır (Çulcu, 2007; Büyükleyla, 2013).

3.6.2.1. RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)

RAPD yöntemi en basit haliyle, istenilen DNA kısımlarının uygun primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır. RAPD yönteminde kullanılan primerler rastgele seçilmektedir ve bu primer dizilimlerinde GC %50 olması reaksiyon etkinliğini arttırmaktadır (Becerril vd., 2001).

Genotoksik etkiye sebep olan maddeler genom üzerinde harabiyet oluşturarak gen ekspresyonunu direkt ya da dolaylı şekilde değişime uğratarak genomda kararsızlık

oluşmasına neden olmaktadır. Bu toksik bileşiklerden dolayı gelişen genetik defektlerde primerlerin bağlandığı alanları değiştirerek farklı RAPD bantlarının meydana gelmesine sebep olmaktadır. RAPD metodunun gen bozulmaları ile ilgili çalışmalarda sağladığı bu yararlı veriler nedeniyle in vitro koşullarda başlangıç aşamasında iyi bir tarama tekniği olduğu düşünülmektedir (Becerril vd., 2001). Primerler, özgün bölgelere rastgele bağlanarak DNA'ların çoğalmasını sağlamaktadır. Tek primer kullanılarak birbirinden farklı türlerle yapılan çalışmalarda oluşan bant profilleri türe özgü olmaktadır. Bu avantaj sayesinde organizmaların birbirinden ayırt edilmesinde RAPD yöntemi kullanılabilmektedir (Litt ve Luty., 1989).

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı çalışma tekniği bakımından kolay olsa bile, markörlerinin dominant olması sebebiyle heterozigotları tespit etmek oldukça zor olmaktadır (Chakraborty, 1981). Ayrıca güvenilirliğinin sınırlı olması, farklı laboratuvarlarda sonuçların değişkenlik göstermesi, hatta cihazlar değiştiğinde bile sonuçların değişebilmesidir (Büyükleyla, 2013).

3.6.2.2. ISSR (Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)

ISSR'ler, kısa tandem tekrarlarının genler arası kısımları olarak adlandırılmaktadır. ISSR metodunda çalışılan primerler, polimorfizm çalışmalarında moleküler markör olarak kullanılmaktadır ve birbirlerine yakın konumda, karşı karşıya pozisyon olarak yerleşmiş tekrar bölgeleri arasında yer alan DNA parçalarından oluşmaktadır. PCR temelli olan bu metodu Zietkiewicz ve arkadaşları 1994 yılında geliştirmiştir. ISSR tekniğinde, ikili, üçlü, dörtlü ve beşli tekrarları olan nükleotit primerleri kullanılarak iki mikrosatellit arası bölge kopyalanmaktadır (Zietkiewicz vd., 1994; ElWahabi ve Bukhari, 2014). ISSR primerleri, bir genomda dizi tekrarının kaybolması ya da tekrarlar arasındaki mesafenin değişmesine neden olan silme, ekleme veya translokasyon oluştuğunda polimorfizm üretmektedir. ISSR primerleri çoğunlukla 3' ya da 5' uçlarının son kısmındaki kısa tandem tekrar bölgelerine yapışıp, genomik lokusları birbirinden farklı bant boyutlarında çoğaltmaktadırlar. Genomda kodlanmayan bölgelerin oranı kodlanan bölgelere göre daha fazladır ve ISSR markörleri kodlanmayan bölgelerdeki mutasyonları göstermektedir. Primerlerin içeriğinde yer alan guanin ve sitozin bazlarının birbirlerine oranları arttıkça bağlanma sıcaklıkları da o kadar artmaktadır. Bu

şekilde kararlı bağlanma meydana gelmektedir (Godwin vd., 1997; Pradeep Reddy vd., 2002; Kesawat ve Das, 2009; Yorgancılar vd., 2015).

Bu metodun en iyi avantajı herhangi bir dizilim bilgisine ihtiyaç duyulmadan primerlerin dizayn edilebilmesi olarak görülmektedir (Godwin vd., 1997; Pradeep Reddy vd., 2002; Kesawat ve Das, 2009; Yorgancılar vd., 2015). Ayrıca ISSR primerlerinin düşük maliyetli olması, çabuk sonuç vermesi, kolaylıkla uygulanabilmesi ve primerlerinin uzun olması sebebiyle doğru sonuç verdiğinin kabul edilmesidir (Bornet ve Branchard, 2001). Metodun en önemli dezavantajı ise tekrarlanabilme olasılığının az olması olarak görülmektedir (Ertuğrul ve Koç, 2011). Bununla birlikte ISSR markörleri polimorfizm miktarları yüksek olduğu için, genom haritalarının oluşturulması, filogenetik çalışmalar, evrim biyolojisi araştırmaları ve özellikle de birçok bitki türünde uygulanabilen güvenilir bir teknik olarak görülmektedir (Pradeep Reddy vd., 2002; Yorgancılar vd., 2015).

3.6.2.3. IRAP (Retrotranspozon arası çoğaltılmış polimorfizm)

IRAP yöntemi ilk kez arpada gen haritalama çalışmalarında kullanılmıştır. Sonrasında buğday, mısır ve soya bitkilerinde en sonunda ise birçok organizma genomunda transpozon taramasında yaygın olarak uygulanmaya başlamıştır (Kalendar vd., 2011).

IRAP yönteminin temeli retrotranspozon DNA'sının genoma entegre edildiği polimorfik bölgelerin tespit edilmesine dayanmaktadır. Retrotranspozonların genomdaki hareketleri, genomik DNA (gDNA) ile LTR (Long Terminal Repeat – Uzun uç tekrarları) dizileri arasında bağ oluşturduğu için, bu diziler moleküler markır olarak kullanılmaktadırlar (Gozukirmizi vd, 2015). Çalışılacak olan retrotranspozonun LTR dizisinin 5' veya 3' ucuyla eşleşen, tek bir primer veya iki primer tasarlanması yeterlidir. Retrotranspozonların LTR dizileri çoğu zaman %90 - %95 aralığında benzerlik göstermektedirler. Bu nedenle PCR'da bir primer, hem ileri hem de geri olarak kullanılabilir (Kalendar, 2011). Bu primerler kullanılarak retrotranspozon dizileri arasındaki genomik DNA bölgeleri kopyalanmaktadır. Retrotranspozonlar, kopyala yapıştır mekanizması ile hareket ettikleri için genomda ne kadar hareket ederlerse o kadar çok sayıda kendilerini kopyalar ve sonuçta IRAP-PCR'da çoğaltılan genomik DNA bölgeleride o kadar çoğalmaktadır (Kalendar ve Schulman, 2006).

Retrotranspozonlar genomda kümelenmiş halde bulunduklarından iki retrotranspozon arası bölge PCR ile çoğaltılabilmektedir. Hareket eden retrotranspozonlar bu süreçte mutasyona yol açtıklarından bireyler arasında farklılık göstererek, DNA parmak izi analizine olanak sağlamaktadır (Kalendar vd., 2011).

IRAP yöntemi, DNA ile ilgili değişimleri saptamak ve türler arasındaki farklılıkları incelemek amacıyla kullanılmaktadır (Yüzbaşıoğlu, Yılmaz ve Gözükırmızı, 2016). IRAP tekniği, polimorfizmlerin belirlenmesinde (bantların varlığı/yokluğu) ve retrotranspozon hareketi ile bağlantılı insersiyon modellerini anlamlandırmada önemlidir. IRAP, parmak izi, bağlantı analizleri, gen haritalama ve genom inceleme analizlerine ek olarak genetik çeşitlilik araştırmalarında da başarıyla uygulanmaktadır. (Kalendar vd., 2000; Manninen vd., 2000; Bernet vd. 2004; Yannic vd., 2004). Birçok araştırma, IRAP tekniğinin gen varyasyonlarını güvenilir, doğru ve etkili bir biçimde değerlendirebildiğini raporlamıştır (Sharma ve Nandineni, 2014; Cheraghi vd., 2018). IRAP metodunda, retrotranspozonların spesifik bir bölgesine primer bağlanması döngünün başlaması için yeterlidir. IRAP tekniği RAPD yönteminin aksine tekrarlanabilen, AFLP'ye göre düşük maliyetli ve daha pratik, RFLP, SNP'ler, AFLP ve mikrosatellitler gibi diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında da genomda oluşan değişimleri belirlemede daha faydalı bir moleküler markır olarak görülmektedir (Schulman vd., 2012).

IRAP yöntemi basittir. Tek bir primerle genomdaki tüm bölgeler taranabilir, ekonomik, güvenilir, tekrarlanabilir. Tüm bu özellikler avantajlı bir yöntem olmasını sağlamaktadır (Schulman vd., 2004).

3.6.2.4. REMAP (Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi)

REMAP, IRAP'a benzeyen bir sisteme sahip olmakla birlikte REMAP (Retrotranspozon-Mikrosatellit Çoğaltma Polimorfizmi) metodunun IRAP tekniğinden farklı olan yönleri bulunmaktadır. REMAP reaksiyonlarında LTR'ye özgü primerlerle beraber mikrosatellit (SSR- Basit Tekrarlı Diziler) dizilerinden yararlanılmaktadır (Yetgin, 2019). Bu yöntemde kullanılan primerler ISSR primerleriyle kombin oluşturmaktadır. REMAP primerlerinden biri IRAP primeriyle tamamlanan ISSR'lere bağlı olduğu için ISSR yönteminin uzamış veya modifikasyona uğramış bir

çeşidi olarak görülmektedir (Kalendar vd., 1999).

3.6.2.5. CRED-RA (Çift restriksiyon enzimli sindirim-rastgele çoğaltma)

CRED-RA, genom metilasyonunun incelenmesi için kullanılan önemli bir yöntemdir. DNA metilasyonlarını ortaya çıkararak epigenetik değişimlerin anlaşılmasını sağlayan bir yöntem olarak kabul edilmektedir (Cai vd., 1996).

Bu teknik, RAPD tekniğinin bir modifikasyonudur ve metilasyona duyarlı enzimler HpaII ve MspI sık sık DNA kesici olarak kullanılmaktadır. Teknikte DNA'nın ilk olarak RAPD PCR'da kopyalanmasıyla elde edilen PCR ürünleri CCGG sekansını tanıyan restriksiyon enzimleriyle kesilip sonrasında ikinci kez PCR'da çoğaltılmasıyla analizleri yapılmaktadır. Oluşan DNA modelleri arasındaki farklılık ile metilasyon düzeyleri arasındaki farklılık tespit edilebilmektedir. Bu yöntemde kullanılan restriksiyon enzimleri rekombinant DNA oluşturulması, gen haritası çalışmaları, polimorfizmlerin saptanması, problemlerin hazırlanması, modifiye DNA'ların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Cai vd., 1996).

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Çalışmada kullanılan lenfosit hücresi

Tez kapsamında kullanılan lenfosit hücresi, insandan elde edilen periferik kanın kromozom medyumuna aktarılıp, 37 °C etüvde 72 saat süreyle kültüre alınmasıyla oluşturulmuştur.

4.1.2. Çalışmada kullanılan cihazlar ve markaları

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 4.1’de verilmiştir

Tablo 4.1. Araştırmada yer alan cihazlar ve markaları

Cihaz adı	Firma adı
Soğutmalı santrifüj	: Hanil Smart R17
Spektrofotometre	: Perkin Elmer Lambda 35 UV-vis
Vorteks	: Heidolph Reaxtop
Hassas terazi	: Shimadzu ATX 120
Magnetik karıştırıcı	: Heidolph MR Hei-Standart
Saf su cihazı	: Nüve
Güç kaynağı	: Thermo EC 300 XL
Buzdolapları	: Arçelik
Otoklav	: Sümer SM3
Jel görüntüleme cihazı	: Vilber Lourmat Quantum ST5
pH metre	: Radiometer meterlab PHM 210
PCR cihazı	: Bio-Rad C1000 Touch
Elektroforez tankı	: Thermo Owl Easycast B2-BP
Mikrodalga fırın	: Arzum
Su banyosu	: Memmert
Derin dondurucu (-80 °C)	: Haer Medical
Kabin	: Bil-ser B2 Class II

4.1.3. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Ethidium bromür çözeltisi

150 µl ethidium bromür 250 ml 0,5 x TBE tamponu içerisine eklenerek hazırlanmıştır.

Oda sıcaklığında ve ışıktan korunarak karanlık ortamda bekletilmiştir.

10 x TE Tamponu

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.

1 x TE Tamponunun hazırlanması

50 ml 10 x TE tamponu 450 ml saf suya ilave edilerek hazırlanmıştır.

10 x TBE

100 g Tris-base

55 g Borik asit

4,65 g EDTA

pH 8 olacak şekilde HCl eklenip, toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklenmiştir.

0,5 x TBE Hazırlanması

95 ml saf suya 5 ml 10 x TBE ilave edilmesiyle hazırlanmıştır.

Primerlerin hazırlanması

Primerler firmanın önerdiği protokole göre 1 x TE ile sulandırılarak stok solüsyonu için diyolifize edilmiştir. Çalışma için kullanılacak solüsyonlar 1µl diyolifize primer ve 4 µl TE karışım oranına göre istenilen miktarda hazırlanmıştır.

DNA izolasyon kiti

Qiagen kandan DNA izolasyon kiti Hazır solüsyonlar halinde firmadan temin edilmiştir.

%95 Etanol

95 ml Etanol + 5 ml saf su karışımı ile elde edilmiştir.

4.1.4. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 4.2. ve Tablo 4.3’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Lenfosit kültürü, Madde uygulaması ve DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar

Kromozom medyum	Lenfosit Kültürü, Madde Uygulama Kimyasalları
PBS (Phosphate Buffer Saline)	
Amaranth gıda boyası	
Qiagen Kandan DNA izolasyon Kiti	DNA İzolasyon Kimyasalları
Proteinaz-K	
Ethanol(%95)	
Ultra saf su	
Buffer AW1	
Buffer AW2	
Buffer AE	

Tablo 4.3. IRAP, ISSR PCR ve UV görüntülemeye kullanılan kimyasallar

Taq DNA polimeraz	IRAP ve ISSR PCR Kimyasalları
10 x PCR Buffer	
Magnezyum Clorid(MgCl ₂)	
Saf su	
dNTP (Deoxynucleotide mix)	
Primer	
1 x TE Tamponu	
Agarose	UV Görüntüleme Kimyasalları
Ethidium Bromide	
6 x DNA Loading dye blue Solution	
TBE (Tris/Borate/EDTA)	
GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder	

4.2. Yöntem

4.2.1. Lenfosit kültürü

4.2.1.1. Kromozom medyumunun hazırlanması

Steril kabinde çalışmaya başlamadan önce %10'luk NaCL ile silinip sonrasında %90'lık alkolle kabin ve kullanılacak pipetler silinmiştir. Her çalışma öncesi bu işlem tekrarlanmıştır. Kromozom medyumları, steril kabinde, 15ml'lik steril falkonlara, 5ml olacak şekilde porsiyonlanmış ve çalışma zamanına kadar saklanması için -20°C buzdolabına yerleştirilmiştir.

4.2.1.2. Kan örneklerinin alınması

Kan örnekleri alınmadan önce gönüllü donör bireylere, Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu onaylatılmıştır. Alkol ve sigara içmeyen, kronik hastalığı olmayan ve son 6 ay içinde ilaç kullanmamış sağlıklı, 25-35 yaşlarında iki erkek, bir kadın bireyden 8 ml periferik kan alınıp iki adet lityum heparinli tüpe 4'er ml olacak şekilde aktarılmıştır. Örnekler bekletilmeden kan örnek taşıma çantasına yerleştirilerek Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarına taşınmıştır.

4.2.1.3. Kan örneklerinin kromozom medyumlarına aktarılması

Kromozom medyumları steril falkonlara 5'er ml olacak şekilde porsiyonlanıp kapakları kapatılmış ve -20 °C dolabına yerleştirilmiştir. Çalışma zamanına kadar dolapta bekletilmiştir. Kan örneklerinin laboratuvara ulaşmasıyla birlikte porsiyonlanan kromozom medyumları -20 °C dolabından alınıp oda sıcaklığında çözünene kadar kaldırılmıştır. Oda sıcaklığına gelen medyumlar 37 °C'lik etüvde 15 dakika bekletilmiştir. Steril kabin açılmış ve gerekli temizlik yapıldıktan sonra medyumlar ve kan örnekleri kabinin içine alınmıştır. Kan örneklerinden 500 mikrolitre (10 damla) kan otomatik pipet yardımıyla alınarak kromozom medyumlarına eklenip, falkonlar ters düz edilerek hafifçe çalkalanıp 37 °C'lik etüve yerleştirilmiştir. Örnekler 72 saat süreyle etüvde bekletilmiştir.

4.2.2. Amaranth gıda boyasının uygulama dozlarının belirlenmesi

Mpountoukas ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış oldukları çalışma ile insan periferik kan hücresi kültürleri, amaranth gıda boyasının 0,02; 0,2; 0,5; 1, 2, 4 ve 8 mM dozlarına maruz bırakılarak amaranthın genotoksik etkileri araştırılmıştır. Çalışmamızda uyguladığımız toksik dozlar bu çalışma baz alınarak belirlenmiştir. Bu çalışmada amaranthın 1 mM, 4 mM ve 8 mM dozları lenfosit kültürlerinin 24. ve 48. saatlerinde uygulanmıştır. Negatif kontrol grubuna toksik madde uygulanmamıştır.

4.2.3. Lenfosit kültürlerinin besiyerinden uzaklaştırılması

Lenfosit kültürü 72. saatte sonlandırılmıştır. Bütün tüpler 1200 rpm'de 15 dakika süreyle soğutmalı santrifüj cihazında döndürülmüş ve sonrasında süpernatant uzaklaştırılmıştır. Tüplerin her birine steril kabinde olmak üzere 1ml PBS 1X (Phosphate Buffered Saline) eklenip hafif biçimde vorteks yapılmıştır. Tekrar 1200 rpm hız ve 15 dakika süreyle santrifüj yapılarak süpernatant uzaklaştırılmış ve sonunda lenfosit hücreleri besiyerinden arındırılmıştır. Lenfosit hücreleri tüpün dip kısmında gözle görülebilmektedir. DNA izolasyonuna başlamadan önce lenfositlerin bulunduğu tüplere 200 µl PBS 1X ilave edilmiştir.

4.2.4. Lenfositlerden DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar Tablo 4.2'de verilmiştir. İzolasyon işlemi qiagen kandan DNA izolasyon kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

- 200 µl PBS eklenmiş olan lenfositler hafifçe vortexlenmiştir.
- Falkonların içinden 200 µl örnek alınıp, 2 µl'lik endpoint tüplerine aktarılmıştır.
- 20 µl proteinaz-k eklenmiştir.
- 200 µl Buffer eklenmiştir. Ardından 10 dakika süreyle 56 °C'lik sıcak su banyosunda etüve bırakılmıştır.
- 200 µl etanol eklendikten sonra vortexlenmiştir.
- Numuneler spin kolona aktarılmıştır (Spin kolona numune isimleri tekrar yazılmıştır).
- 8000 rpm'de 1dk santrifüj edilmiştir.

- 500 µl Buffer AW1 eklenip sonrasında 8000 rpm’de 1 dk santrifüj yapılmıştır.
- 500 µl Buffer AW2 eklenip, 14.000 rpm’de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- Kolonun altındaki süpernatantı atılıp, 2 tane kapaklı tüp iç içe olacak şekilde yeni bir mikrosantrifüj tüpünün içine yerleştirilmiştir.
- 200 µl Buffer AE eklenip 1 dk oda sıcaklığında inkübasyon bırakıldıktan sonra 8000 rpm’de 1 dk süreyle santrifüj yapılmıştır.

4.2.5. DNA konsantrasyon ve kalite tayini

DNA örneklerinin miktar ve kalite tayini için, 2 µl DNA örneği ile Nanodrop spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA konsantrasyonunu ng /µl olarak ve 260/280 nm boyutundaki absorbans seviyesi izole edilen DNA’nın saflık düzeyini ifade etmektedir. DNA saflığı 1,8 – 2,1 aralığında olan örnekler çalışmada kullanılmıştır. DNA miktarını değerlendirirken nanodrop ölçümlere ek olarak DNA’lar %0,8’lik agaroz jelde 100 Volt ve 70 Amper’de 40 dakika süreyle yürütülerek jel görüntüleme cihazında gözlemlenmiştir.

4.2.6. IRAP PCR

Araştırmada IRAP retrotranspozonları kullanılarak amaranth gıda boyasının, insan lenfositlerindeki genotoksik etkisi, incelenmiştir. IRAP PCR için kullanılan primerler baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.4’de verilmiştir. Toplamda 5 adet IRAP primeri kullanılmıştır. Her bir primer tüm bireylere uygulanmıştır. PCR uygulamaları Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.4. IRAP’da kullanılan primerler, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer Adı	Baz Dizilimi 5’3’	Bağlanma Sıcaklığı(°C)
SUKKULA	GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC	63,3
SIRE1	GCAGTTATGCAAGTGGGATCAGC	51
3LTR5	TGTTTCCCATGCGACGTTCCCAACA	64,6
5LTR1	TTGCCTCTAGGGCATATTTTCCAACA	58,4
NIKITA-E2647	ACCCCTCTAGGCGACATCC	58,7

IRAP PCR master-mix karışım ve miktarları tüm primerler için aynı ölçüde kullanılmıştır. Master-mix bileşenleri ve miktarları Tablo 4.5’de yer almaktadır.

Tablo 4.5. IRAP bileşenleri ve miktarları

Bileşen	Miktar (µl)
PCR buffer	2
dNTPs	0,3
Magnezyum Clorid	1,25
IRAP primer	1
Taq DNA polimeraz	0,5
Ultra saf su	13,95
Genomik DNA	1
Toplam Hacim	20

Bütün primerler, 2 erkek 1 kadın bireyden elde edilen ve 3 farklı dozda (Negatif kontrol, 1 mM, 4 mM, 8 mM) amaranth gıda boyasına maruz bırakılan insan lenfositlerinden izole edilmiş genomik DNA örneklerinin tamamına IRAP yöntemi uygulanmıştır. IRAP döngü protokolü Bulut’un (2018) çalışmasında kullanılan protokol ile ve Tablo 4.6’da verilen programa göre uygulanmıştır. Kullandığımız protokolda her primer için bağlanma sıcaklığı primere özgü olacak şekilde değiştirilmiştir.

Tablo 4.6. IRAP PCR döngü protokolü

Döngü adı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyon	95	5 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	2
Primer Bağlanma sıcaklığı	(spesifik)	1 dk.	1
Uzama	72	2 dk.	1
Denatürasyon	95	30 sn.	41
Primer Bağlanma sıcaklığı	(spesifik)	1 dk.	1
Uzama	72	2 dk.	1

4.2.7. ISSR PCR

Araştırmada amaranth gıda boyasının, insan lenfositlerindeki genotoksik etkisi ISSR PCR yöntemi ile çalışılmıştır. ISSR için kullanılan primerler, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 4.7’de yer almaktadır. ISSR analizleri her bir primer için spesifik olacak şekilde yapılmıştır. PCR reaksiyonları Bio-Rad C1000 Touch PCR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.7. ISSR’de kullanılan primerler, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları

Primer Adı	Baz Dizilimi 5’3’	Bağlanma Sıcaklığı(°C)
UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50
UBC810	GAGAGAGAGAGAGAGAT	50
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	50
UBC816	CACACACACACACACAT	50
UBC817	CACACACACACACACAA	50
UBC868	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	47
UBC825	ACACACACACACACACT	50
UBC830	TGTGTGTGTGTGTGTGG	53
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	54
UBC840	GAGAGAGAGAGAGAGACT	54
UBC848	CACACACACACACACAAG	54
UBS856	ACACACACACACACACYA	54
UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	56
UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	56
UBC899	CATGGTGTGGTTCATTGTTCCA	58
UBC818	CACACACACACACACAG	53

Y: T ya da C

ISSR PCR master-mix karışım ve mitarları tüm primerler için aynı ölçüde kullanılmıştır. Master-mix bileşenleri Tablo 4.8’de yer almaktadır. ISSR döngü protokolü Bulut ve arkadaşlarının (2019) çalışmasında kullanılan protokol değiştirilerek, Tablo 4.9’da verilen programa göre uygulanmıştır.

Tablo 4.8. ISSR PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşen	Miktar (µl)
PCR buffer	2
dNTPs	0,3
Magnezyum Clorid	1,25
Primer	1
Taq DNA polimeraz	0,5
Ultra saf su	13,95
Genomik DNA	1
Toplam Hacim	20

Tablo 4.9. ISSR PCR döngü protokolü

Döngü adı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç Denatürasyon	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	40 sn	1
Primer Bağlanma sıcaklığı	(spesifik)	40 sn	1
Uzama	72	2 dk	1
Denatürasyon	94	40 sn	35
Primer Bağlanma sıcaklığı	(spesifik)	40 sn	1
Uzama	72	2 dk	1

4.2.8. IRAP PCR ürünlerinin jel elektroforezi

IRAP PCR ürünleri %1,9'luk olarak hazırlanmış agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Jel hazırlığında kullanılan kimyasallar Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Agaroz jel içeriğinde yer alan 0,5 x TBE tamponu, 10 x TBE tamponunun saf su ile oranlanmasıyla elde edilmiştir. %1,9'luk agaroz jel elde edebilmek için 2,47g agaroz (Biomax) tartılıp balon joje içine aktarılmıştır ve üzerine 130 ml 0,5 x TBE tamponu ilave edilip balo jojenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Elde edilen karışım mikrodalga fırına yerleştirilerek yaklaşık 4 dk süreyle homojenlik gerçekleşene kadar ısıtılmıştır. Mikrodalgadan çıkarılan homojen karışımın içine derece yerleştirilerek son sıcaklık 57 °C olacak şekilde soğumaya bırakılmıştır. Uygun sıcaklığa ulaştıktan sonra üzerine 9µl etidyum bromür (EtBr) pipet yardımıyla ilave edilmiş ve hafifçe

karıştırılmıştır. EtBr toksik bir madde olduğundan kullanımı maske takılarak kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Yatay elektroforez kasetine 20'lik tarak yerleştirilip, hazırlanan agaroz çözeltisi kasete dikkatlice ve hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dökülmüştür. Jel, oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuştur ve hazır hale gelince, tarak kuyucuklara zarar vermeden çıkarılmış, sonrasında daha önceden hazırladığımız 0,5 x TBE tamponu jel kaseti üzerine dökülmüştür. 8 µl PCR ürünü ve 2 µl 6X yükleme tamponu birleştirilip pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır. Ardından kuyucuklara yüklenmiştir. PCR ürünleri 100 Volt, 70 Amper'de 95 dakika yürütülmüştür.

4.2.9. ISSR PCR Ürünlerinin Jel elektroforezi

İyi kalitede bant görüntüsü elde edebilmek için ISSR PCR ürünleri için hazırlanan jel, IRAP PCR için kullanılan jelden farklı olarak hazırlanmıştır. ISSR PCR ürünleri %1,6'lık olarak hazırlanmış agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Jel içeriğinde bulunan kimyasallar Tablo 4.3'de verilmiştir. Agaroz jelde içeriğinde yer alan 0,5 x TBE tamponu, IRAP için hazırlanan jelde olduğu gibi 10X TBE tamponunun saf su ile oranlanmasıyla elde edilmiştir. %1,6'lık agaroz jel elde edebilmek için 2,08g agaroz (Biomax) tartılıp balon joje içine aktarılmıştır ve üzerine 130 ml 0,5X TBE tamponu ilave edilip balon jojenin ağzı alüminyum folyo ile kapatılmıştır. Elde edilen karışım mikrodalga fırına yerleştirilerek yaklaşık 4 dk süreyle, homojenlik gerçekleşene kadar ısıtılmıştır. Mikrodalgadan çıkarılan homojen karışımın içine derece yerleştirilip son sıcaklık 57 °C olacak şekilde soğumaya bırakılmıştır. Uygun sıcaklığa ulaştıktan sonra üzerine 8µl etidyum bromür (EtBr) pipet yardımıyla ilave edilmiş ve hafifçe karıştırılmıştır. EtBr toksik bir madde olduğundan kullanımı sırasında yine kişisel koruyucu ekipmanlar kullanılmış ve uygulama kabinde gerçekleştirilmiştir. Yatay elektroforez kasetine 20'lik tarak yerleştirilip, hazırlanan çözelti kasete dikkatlice ve hava kabarcığı oluşmayacak şekilde dökülmüştür. Jel, oda sıcaklığında bekletilerek soğutulmuştur ve hazır hale gelince, tarak kuyucuklara zarar vermeden çıkartılmış sonrasında 0,5 x TBE tamponu jel kasetine dökülmüştür. 8 µl PCR ürünü ve 2 µl 6X yükleme tamponu birleştirilip pipetaj yapılarak karışması sağlanmıştır. Ardından kuyucuklara yüklenmiştir. PCR ürünleri 95 Volt ve 70 Amper'de 90 dakika yürütülmüştür.

4.2.10. GTS (Genomik Kararlılık Sabitliği) hesaplanması

Bazı araştırmacılar toksik ajanın maruziyeti ile bant profillerinde oluşan değişimi (polimorfizmi), genotoksik etkinin göstergesi olarak değerlendirmektedir (Noel ve Rath, 2006). Ancak bazı çalışmalarda kontrole göre polimorfizm yüzdesi hesaplanarak analiz yapılmıştır (Liu vd., 2007).

Kontrol örneğinin GTS yüzdesi 100 olarak kabul edilmektedir. Madde uygulanan örnekler için GTS oranı $100 \times (1 - a/n)$ formülü (formülde a: polimorfik bant sayısı, n: negatif kontrol bant sayısı) kullanılarak hesaplanmıştır (Atienzar, 1999).



5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tez çalışmasında amaranth gıda boyasının insan lenfositlerinde meydana getirdiği genotoksik etkinin IRAP-PCR ve ISSR-PCR yöntemleri kullanılarak belirlenmesi hedeflenmiştir.

5.1. DNA Saflık ve Miktar Ölçüm Bulguları

DNA örneklerinin spektrofotometre ölçüm sonuçları Tablo 5.1’de verilmiştir. Saflığı 1,8 – 2,1 aralığında olan DNA’lar saf olarak kabul edilmiştir.

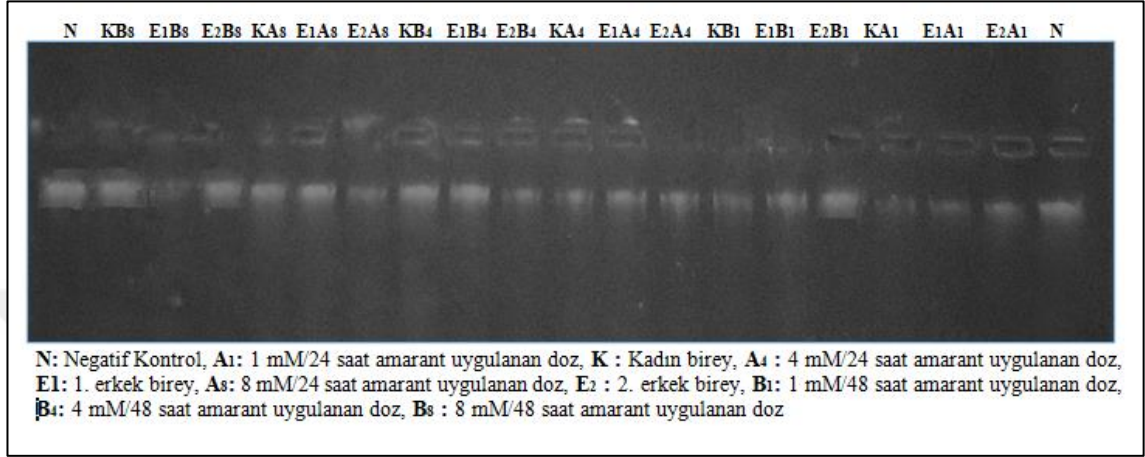
Tablo 5.1. İnsan lenfositlerinden elde edilen DNA’ların miktar ve saflıkları

DNA’lar	DNA miktarı(ng/ml)	DNA saflığı(260/280)
N	41,98	1,923
KB ₈	52,116	1,88
E ₁ B ₈	35,744	1,83
E ₂ B ₈	31,355	1,927
KA ₈	42,409	1,861
E ₁ A ₈	37,358	1,993
E ₂ A ₈	55,121	1,863
KB ₄	32,126	1,912
E ₁ B ₄	53,167	1,998
E ₂ B ₄	28,112	2,01
KA ₄	39,356	1,873
E ₁ A ₄	56,115	1,936
E ₂ A ₄	43,76	1,802
KA ₁	28,405	1,984
E ₁ B ₁	34,08	1,807
E ₂ B ₁	29,282	1,991
KA ₁	30,052	1,875
E ₁ A ₁	49,506	2,03
E ₂ A ₁	53,226	1,904

N: Negatif Kontrol, A₁: 1 mM/24 saat amarant uygulanan doz, K : Kadın birey, A₄ : 4 mM/24 saat amarant uygulanan doz, E₁: 1. erkek birey, A₈: 8 mM/24 saat amarant uygulanan doz, E₂ : 2. erkek birey, B₁: 1 mM/48 saat amarant uygulanan doz, B₄: 4 mM/48 saat amarant uygulanan doz, B₈ : 8 mM/48 saat amarant uygulanan doz

5.1.1. Lenfositlerden izole edilen DNA'ların jel elektroforezi

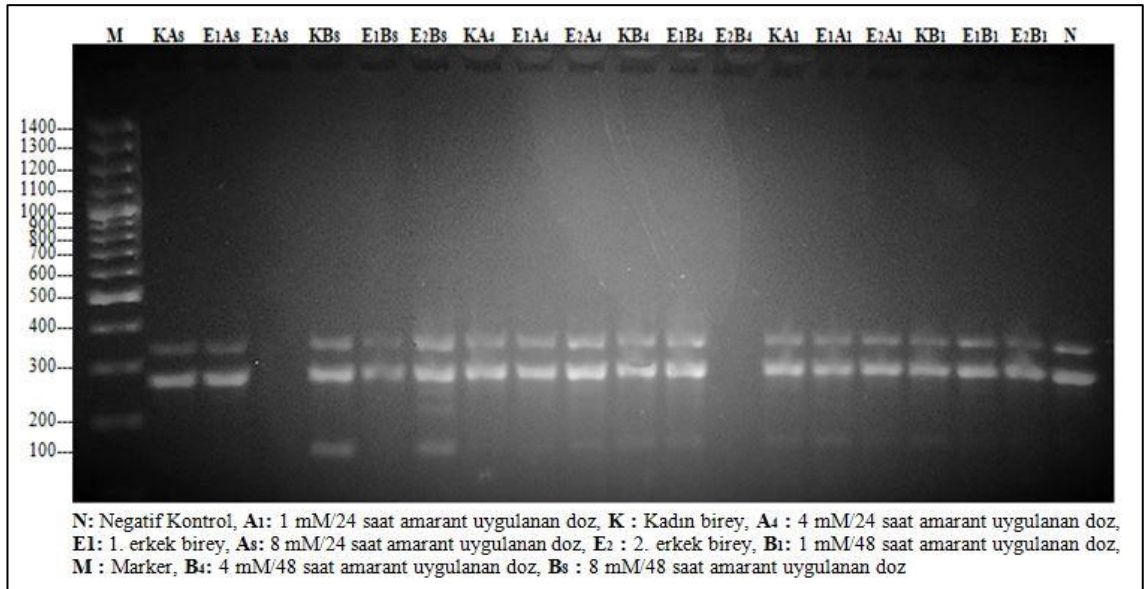
DNA'lar %0,8'lik jelde 100 Volt, 70 Amper'de 90 dk yürütülmüştür. Jel hazırlamada kullanılan kimyasallar Tablo 4.3'de verilmiştir. UV ışığı altında incelenen DNA görüntüleri Şekil 5.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 5.1. İzole edilen DNA'ların jel görüntüsü

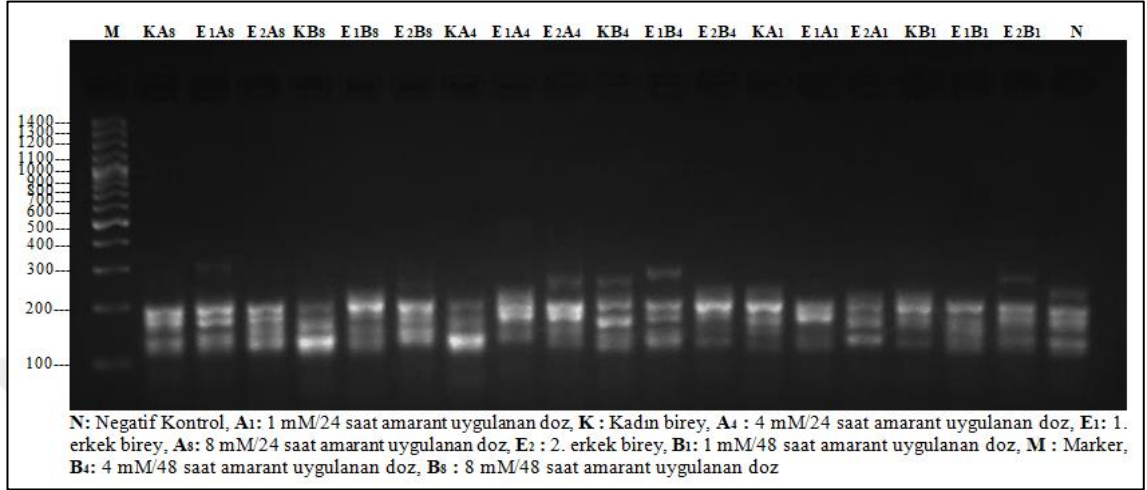
5.2. IRAP PCR Analizleri

Şekil 5.2'de Nikita-E2647 primeri ile yapılan IRAP-PCR bantları yer almaktadır. 18 örnekte toplam 27 polimorfik bant oluştuğunu göstermektedir. E2B8 ve E2B4 örnekleri hariç diğer tüm örnekler Nikita-E2647 primerine cevap vermiştir.



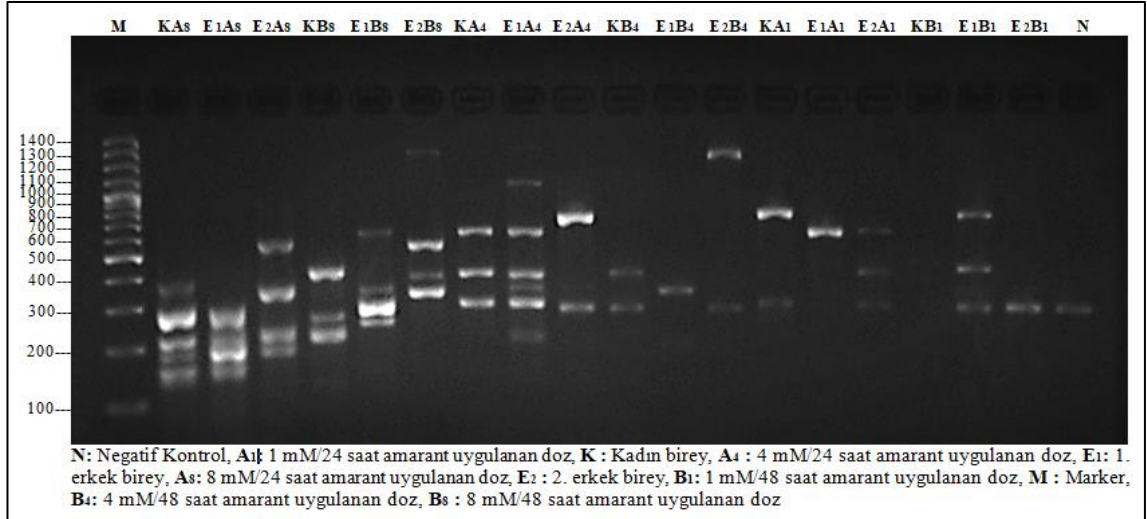
Şekil 5.2. Nikita-E2647 primer jel görüntüsü

Şekil 5.3’de 3LTR-5 primeri ile yapılan IRAP-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 18 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Örneklerin tamamı 3LTR-5 primerine cevap vermiştir.



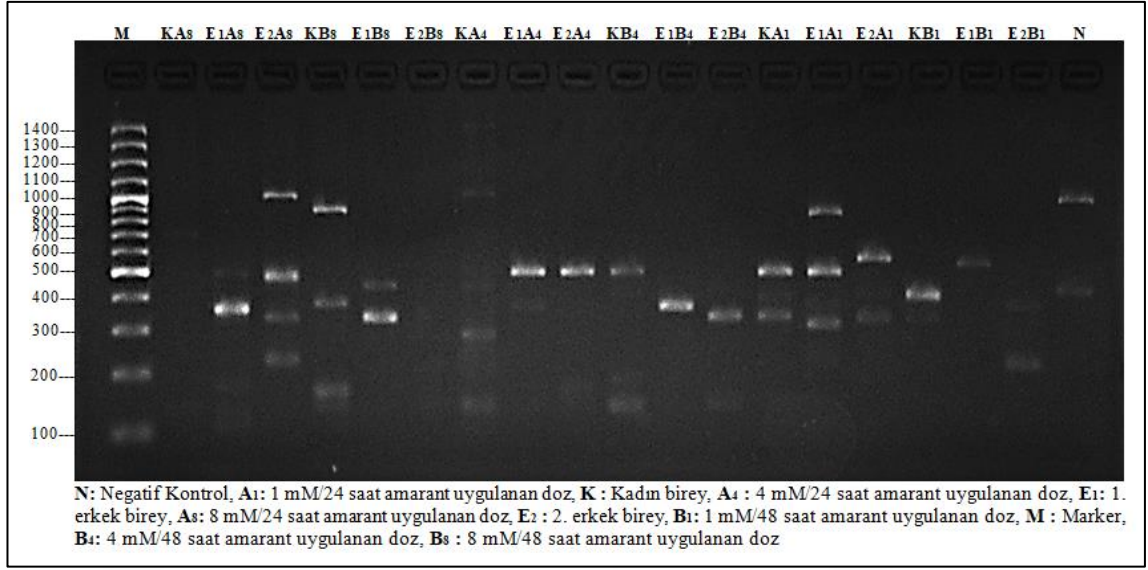
Şekil 5.3. 3LTR-5 primer jel görüntüsü

Şekil 5.4’de 5LTR-1 primeri ile yapılan IRAP-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 42 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik doz ve süresi arttıkça bant sayısının arttığı tespit edilmiştir.



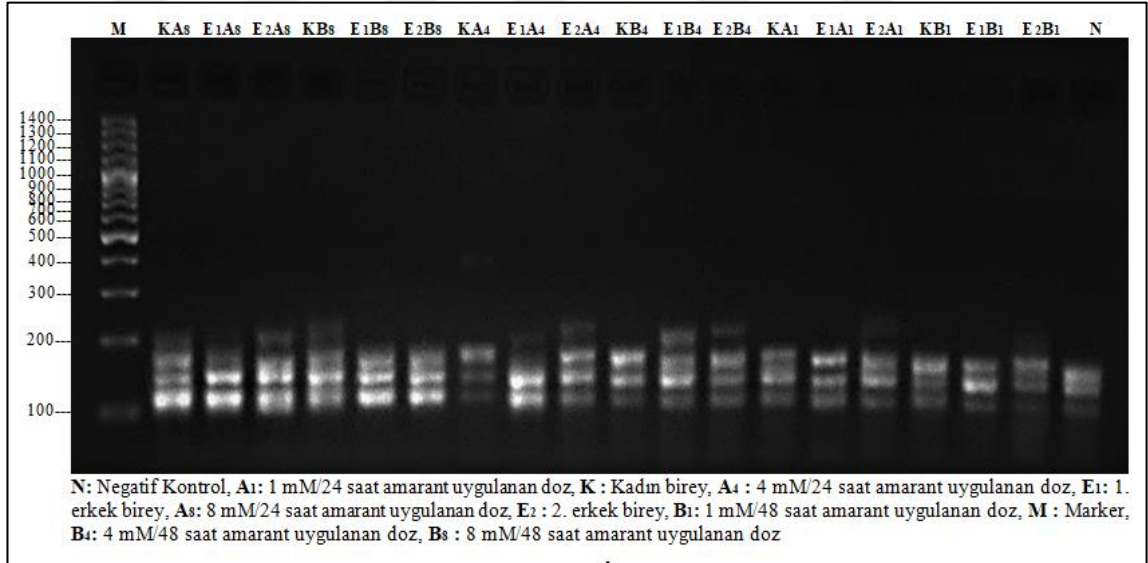
Şekil 5.4. 5LTR-1 primer jel görüntüsü

Şekil 5.5’de SIRE-1 primeri ile yapılan IRAP-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 42 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik doz ve süresi arttıkça bant sayısının arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.5. SIRE-1 primer jel görüntüsü

Şekil 5.6’da Sukkula primeri ile yapılan IRAP-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar 18 örnekte toplam 12 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. 1 mM’lık doz ve 24 saat süreyle uygulanan toksik dozlarda polimorfik bant oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 5.6. Sukkula primer jel görüntüsü

5.2.1. IRAP-PCR polimorfizm ve GTS analizleri

IRAP PCR ürünlerinin jel görüntüsü incelenerek elde edilen veriler (yeni bant oluşumu/bant kaybolması) ve analiz sonuçları (GTS değeri ve polimorfizm oranı) Tablo 5.2’de yer almaktadır.

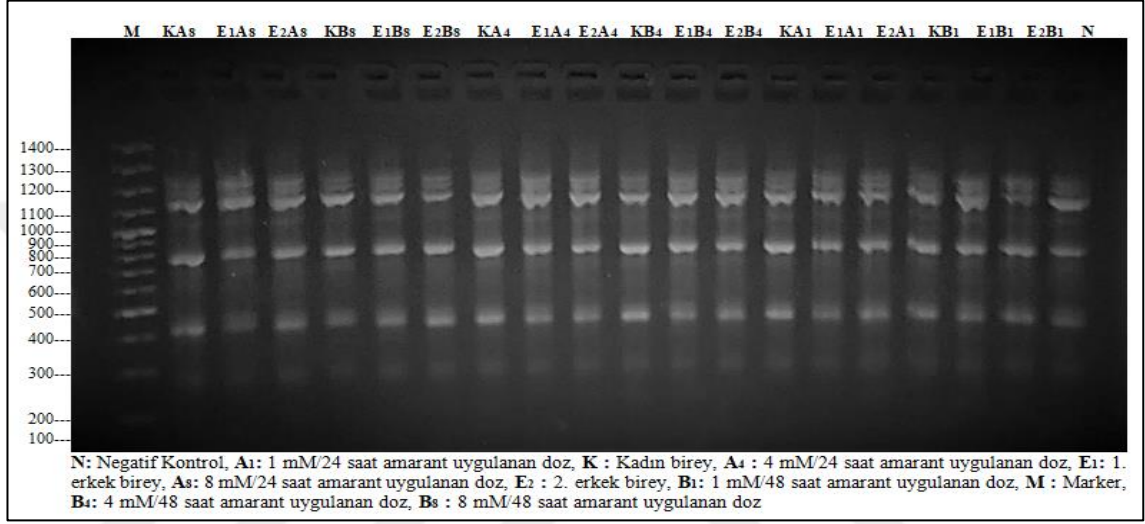
Tablo 5.2. IRAP PCR polimorfizm ve GTS tablosu

Primer	K	KB ₈	E1B ₈	E2B ₈	KA ₈	E1A ₈	E2A ₈	KB ₄	E1B ₄	E2B ₄	KA ₄	E1A ₄	E2A ₄	KB ₁	E1B ₁	E2B ₁	KA ₁	E1A ₁	E2A ₁
Nikita-E2647	2	+240,7 +187,6	+187,61	+240,6 +200,8 +125,2		+145,1		+249,7 +157,6	+227,3 +145,1	+249,0 +200,8 +157,6	+206,8 +145,1	+206,8 +145,1	+206,8 +145,1	+247,3 +157,8	+157,8	+157,8	+148,2	+148,2	+148,2
3LTR5	4	-243,5	+317,8		-243,5	+200,2	-243,5	-243,5	+310,2	+104,1	-243,5	-243,5 +156,1	-243,5	-243,5	-243,5	-243,5	-243,5	-243,5	+267,8
5LTR1	1	+397,1 +289,5 +207,3 +198,2 +165,4	+289,5 +207,3 +198,2 +165,4	+197,4 +207,1 +326,5 +590,4	+400,5 +233,4 +207,1	+217,4 +246,2 +307,5 +603,7	+304,5 +319,6 +593,4 +1.300,5	+401,3 +607,8	+200,0 +289,6 +403,8 +607,5 +1.100	+612,8	+403,9	+338,9	+1.100,2	+621,9	+602,61 +437,3	+602,1 +437,3	+435,6	+685,1 +437,1	
SIRE1	2		-1.100,5 +503,2	+387,5 +503,1	+1.050 +401,2 +187,5	+402,8 +313,4 -1.100,5		+504,1 +303,4 +167,2	-110,5	+515,2 -1.100,5 -417,6	+513,1 +187,4 -110,5 -417,6	-1.100,5 +347,6	-1.100,5 +337,5 +175,2	-1.100,5 +515 +337,5	-1.100,5 +1050 +520,1 +325,4	+587,2 +325,9	+517,8 -1.100,5	+587,6 -1.100,5	+313,2 +225,4 -1.100,5
Sukkula	3	+200,8	+197,6 -107,5	+200,3	+197,4		-159,45	+298,2	+210,9	+283,6		+298,2	+386,1			+199,1			
Toplam Bant Sayısı	12	9	10	10	8	9	8	9	10	9	9	8	8	7	8	8	5	6	5
GTS Değeri		25	16,67	16,67	33,3	25	33,3	25	16,67	25	25	33,3	33,3	41,67	33,3	33,3	58,33	50	58,33
Poliforfizm Oranı		75	83,33	83,33	66,7	75	66,7	75	83,33	75	75	66,7	66,7	58,33	66,7	66,7	41,67	50	41,67

N: Negatif Kontrol, A₁: 1 mM/24 saat amarant uygulanan doz, K : Kadın birey, A₄ : 4 mM/24 saat amarant uygulanan doz, E₁: 1. erkek birey, A₈: 8 mM/24 saat amarant uygulanan doz, E₂ : 2. erkek birey, B₁: 1 mM/48 saat amarant uygulanan doz, B₄: 4 mM/48 saat amarant uygulanan doz, B₈ : 8 mM/48 saat amarant uygulanan doz

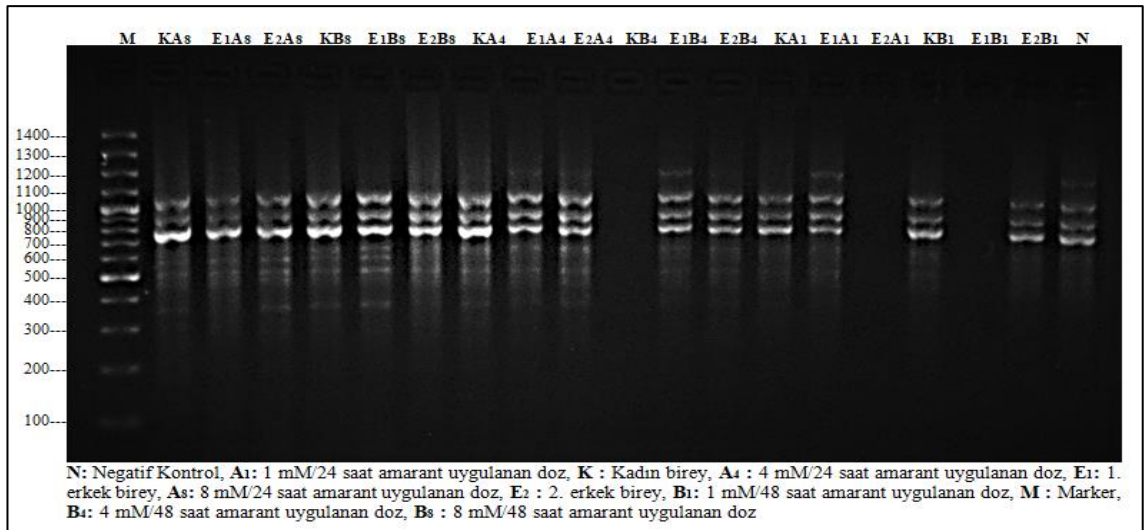
5.3. ISSR-PCR Analizleri

Şekil 5.7’de UBC807 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. 18 örnekte toplam 6 polimorfik bant oluştuğu saptanmıştır. Toksik dozun 8 mM olan dozlarında 24 ve 48 saat süren maruziyetlerde polimorfik bant tespit edilmiştir. Diğer dozlarda polimorfik bant gözlenmemiştir.



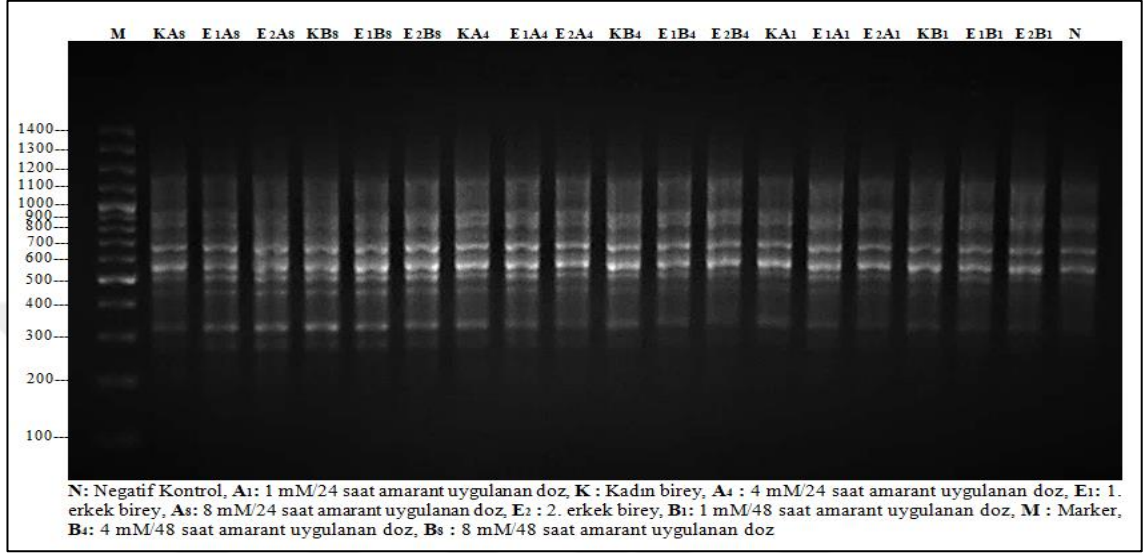
Şekil 5.7. UBC807 Primer jel görüntüsü

Şekil 5.8’de UBC810 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar 18 örnekte toplam 57 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik doz ve süresi arttıkça bant sayısının arttığı tespit edilmiştir. KA4, E2B1, E1A1 örnekleri UBC810 primerine cevap vermemiştir.



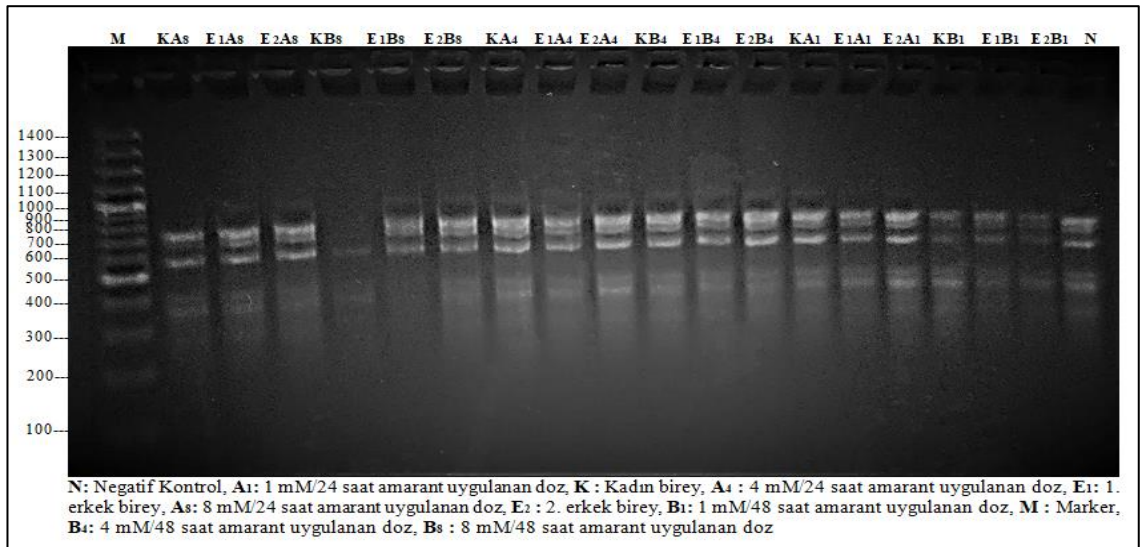
Şekil 5.8. UBC810 primer jel görüntüsü

Şekil 5.9’da UBC812 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar 18 örnekte toplam 27 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik doz ve süresi arttıkça bant sayısının arttığı tespit edilmiştir. Örneklerin tamamı UBC812 primerine cevap vermiştir.



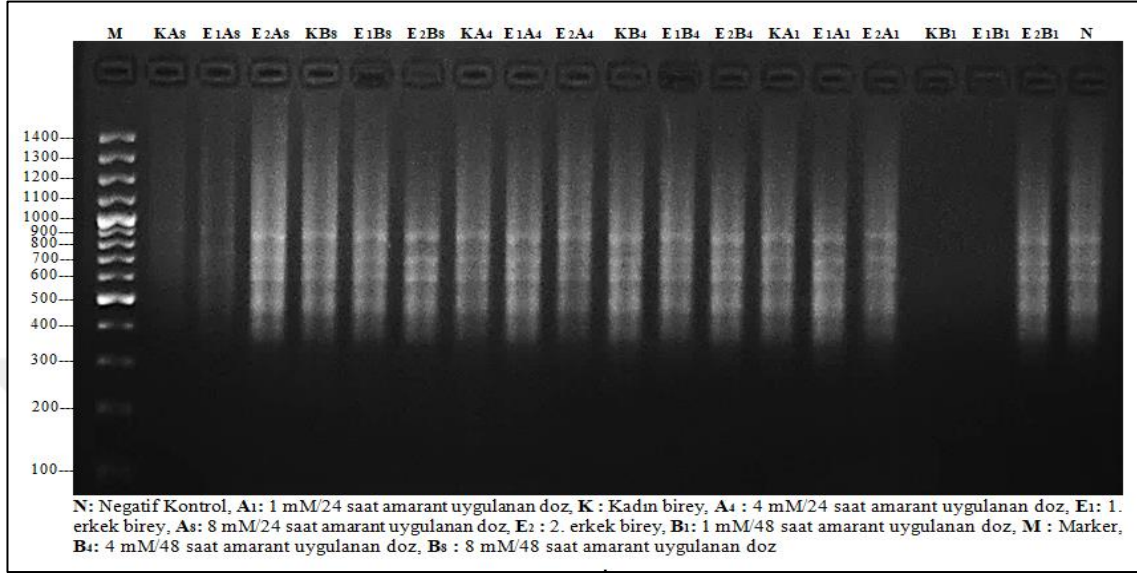
Şekil 5.9. UBC812 primer jel görüntüsü

UBC816 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları Şekil 5.10’da verilmiştir. Sonuçlar 18 örnekte toplam 22 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun miktarı ve uygulanma süresi arttıkça bant sayısının arttığı belirlenmiştir. 1 mM’lık toksik dozun 24 ve 48 saatlik maruziyet sürelerinin her ikisinde de polimorfik bant gözlenmemiştir. Örneklerin tamamı UBC816 primerine cevap vermiştir.



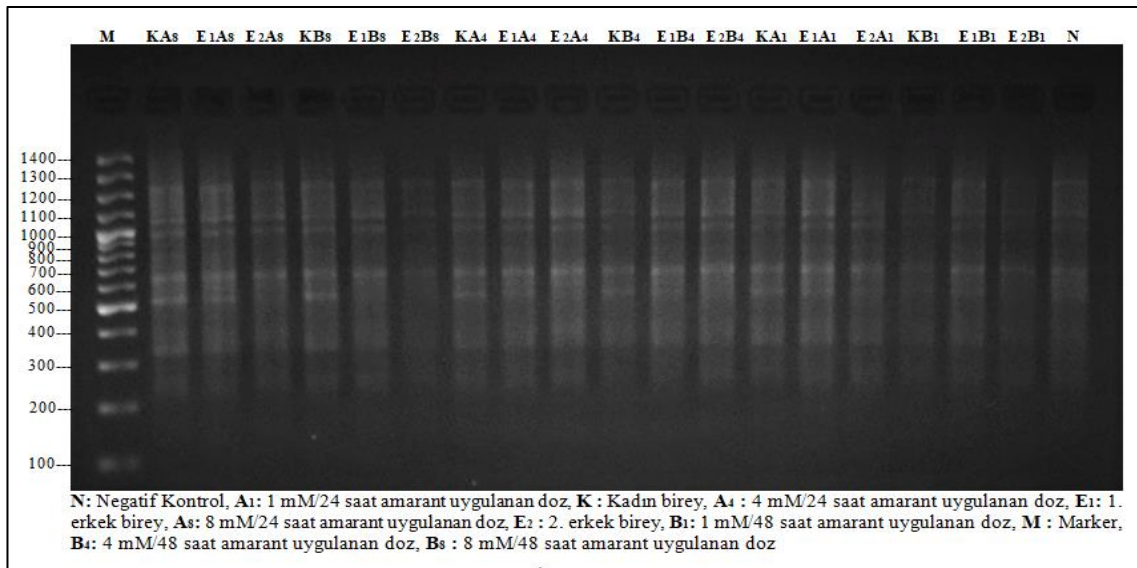
Şekil 5.10. UBC816 primer jel görüntüsü

Şekil 5.11’de UBC817 primeri ile yapılan ISSR-PCR verileri yer almaktadır. Sonuçlar 18 örnek ile yapılan çalışmada polimorfik bant oluşmadığını göstermiştir. KA₁, KB₈ ve E₁A₁ örnekleri UBC817 primerine cevap vermemiştir.



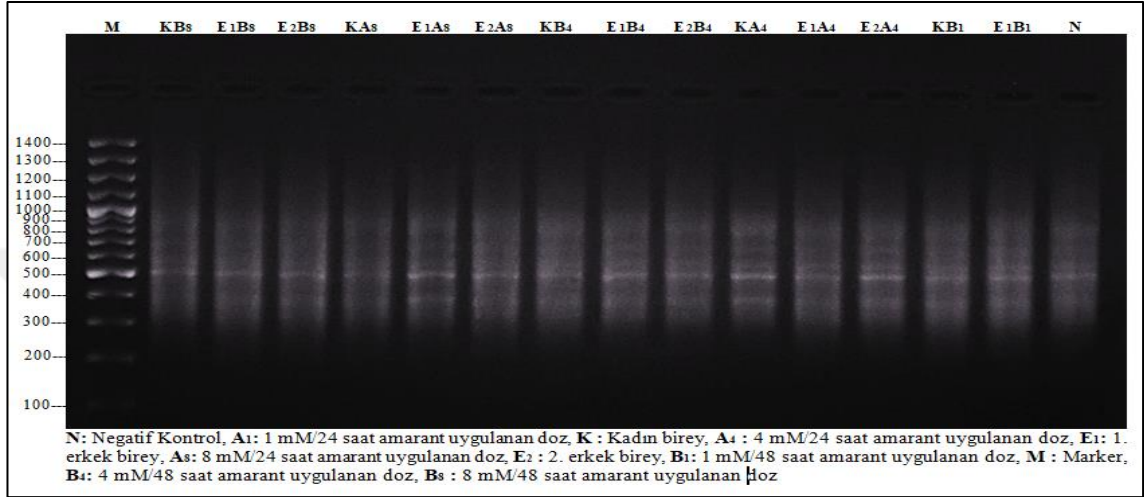
Şekil 5.11. UBC817 primer jel görüntüsü

Şekil 5.12’de UBC868 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 8 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun 8 mM uygulanan dozların 24 ve 48 saat süren maruziyetlerin her ikisinde de polimorfik bant oluşumu gözlenmiştir. Diğer uygulanan (4 mM, 1 mM) dozlarda polimorfik bant oluşumu tespit edilmemiştir. Örneklerin tamamı UBC868 primerine cevap vermiştir.



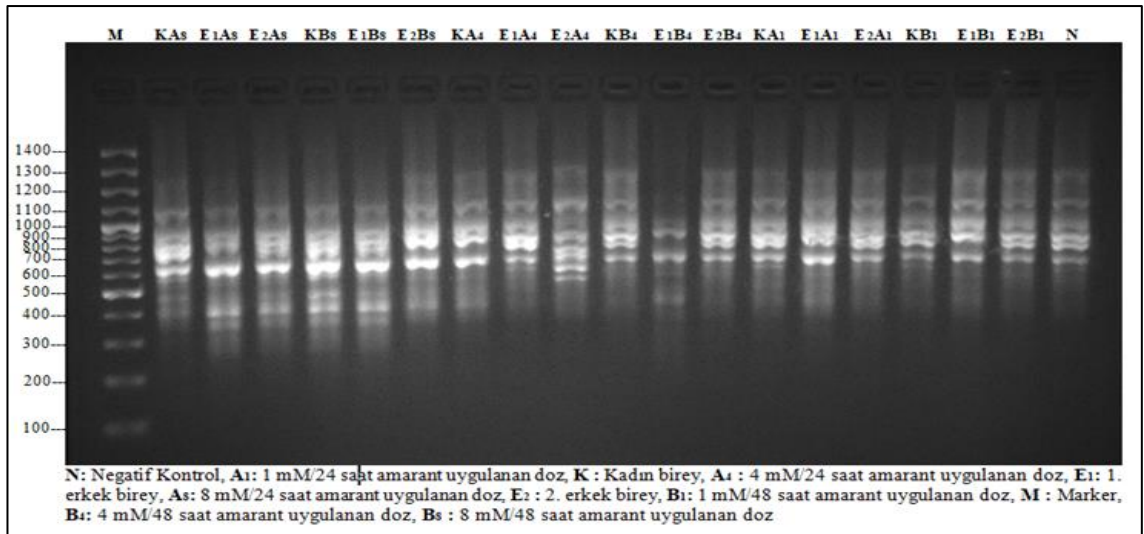
Şekil 5.12. UBC868 primer jel görüntüsü

Şekil 5.13’de UBC825 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 7 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun 8 mM uygulanan dozların 24 ve 48 saat süren maruziyetlerin her ikisinde de polimorfik bant oluşumu gözlenmiştir. Diğer uygulanan (4 mM, 1 mM) dozlarda polimorfik bant oluşumu tespit edilmemiştir. Örneklerin tamamı UBC8305 primerine cevap vermiştir.



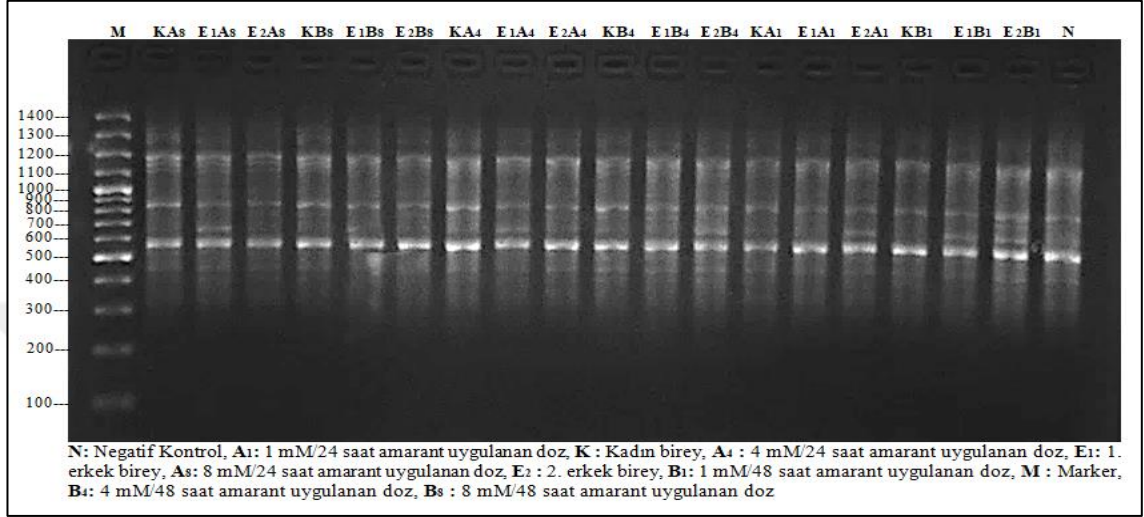
Şekil 5.13. UBC825 primer jel görüntüsü

Şekil 5.14’de UBC830 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 28 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun miktarı ve uygulanma süresi arttıkça bant sayısının arttığı belirlenmiştir. 1 mM’lık toksik dozun 24 saatlik maruziyet süresinde polimorfik bant gözlenmemiştir. Örneklerin tamamı UBC830 primerine cevap vermiştir.



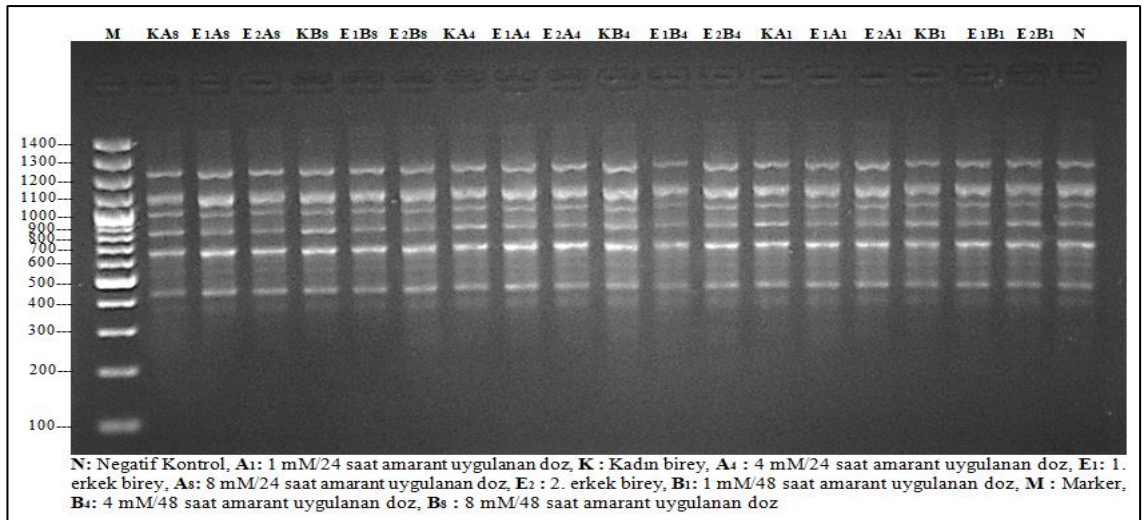
Şekil 5.14. UBC830 primer jel görüntüsü

Şekil 5.15’de UBC836 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 40 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun miktarı ve uygulanma süresi arttıkça bant sayısının arttığı belirlenmiştir. Örneklerin tamamı UBC836 primerine cevap vermiştir.



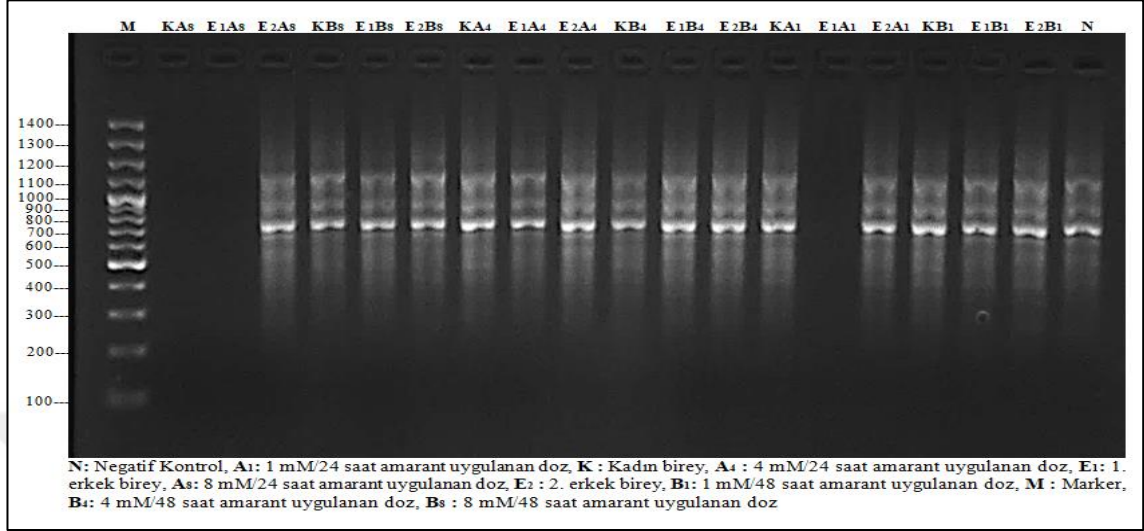
Şekil 5.15. UBC836 primer jel görüntüsü

Şekil 5.16’da UBC840 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 4 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun 8 mM uygulanan dozlarının sadece 48 saat süren maruziyetlerinde polimorfik bant oluşumu gözlenmiştir. Diğer uygulanan (8 mM/24 saat, 4 mM/24-48 saat, 1 mM/24-48 saat) dozlarda polimorfik bant oluşumu tespit edilmemiştir. Örneklerin tamamı UBC840 primerine cevap vermiştir.



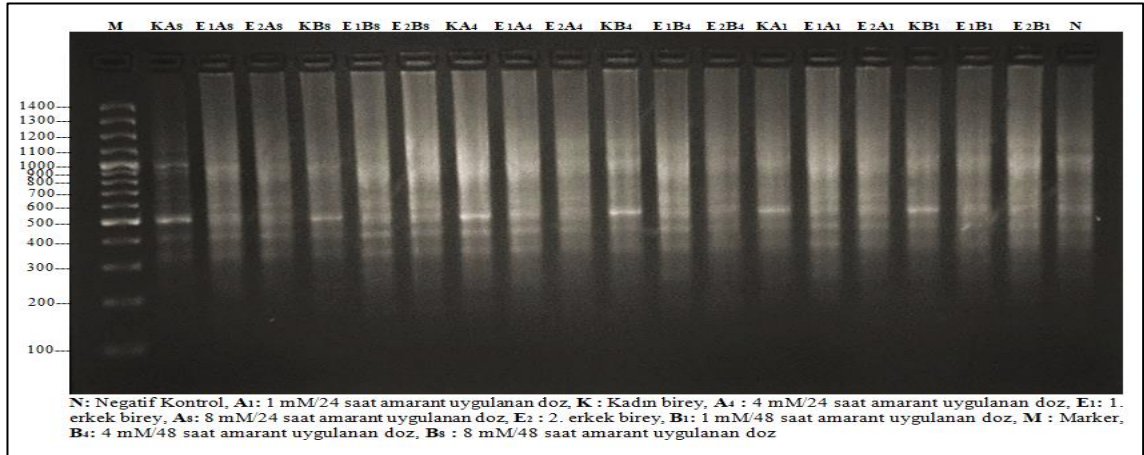
Şekil 5.16. UBC840 primer jel görüntüsü

Şekil 5.17’de UBC848 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte polimorfik bant oluşmadığını göstermiştir.



Şekil 5.17. UBC848 primer jel görüntüsü

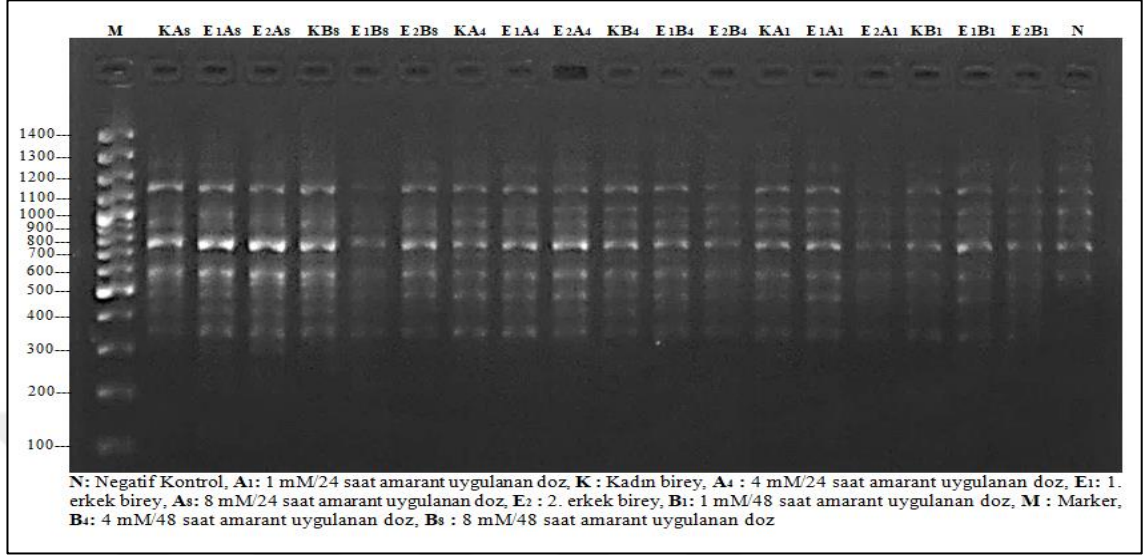
Şekil 5.18’de UBC856 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 16 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun 1 mM olan miktarı ve 24 saat süreyle uygulandığı çalışmada polimorfik bant oluşumu gözlenmemiştir. Diğer uygulanan doz ve sürelerin tamamında polimorfik bant oluşumu gözlenmiştir. Örneklerin tamamı UBC856 primerine cevap vermiştir.



Şekil 5.18. UBC856 primer jel görüntüsü

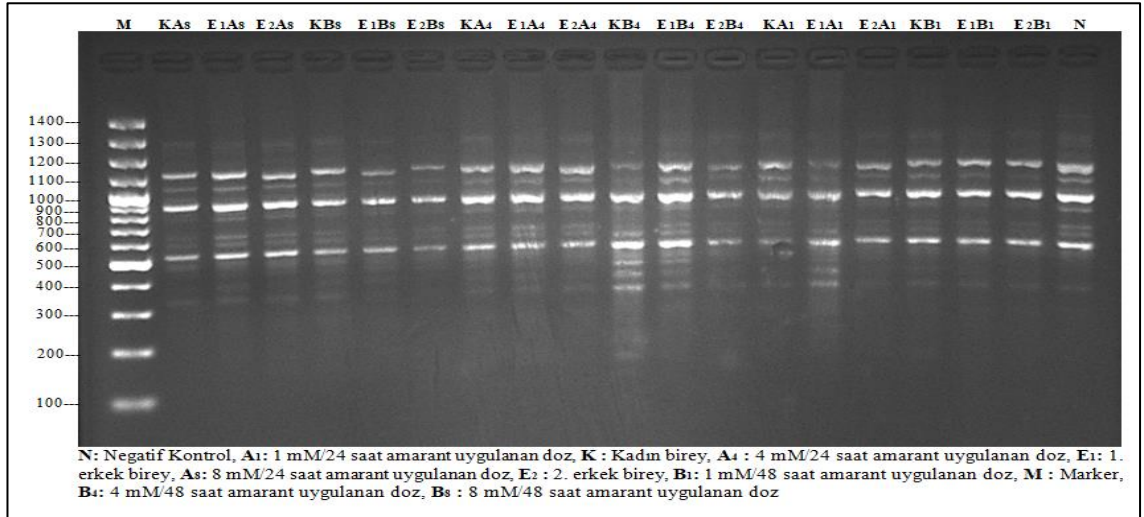
Şekil 5.19’da UBC841 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 48 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik dozun miktarı ve

uygulanma süresi arttıkça bant sayısının arttığı belirlenmiştir. Örneklerin tamamı UBC841 primerine cevap vermiştir.



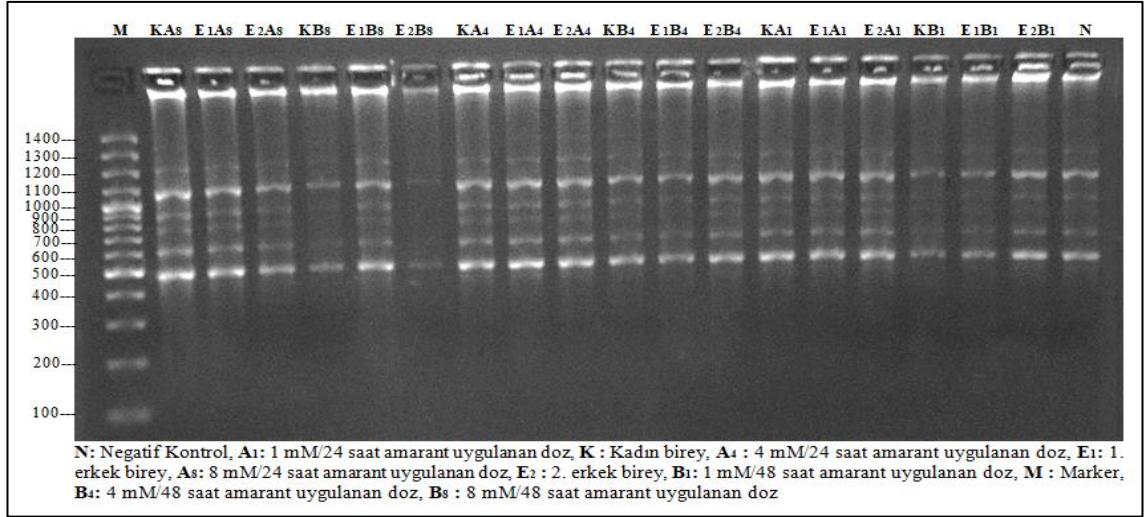
Şekil 5.19. UBC841 primer jel görüntüsü

Şekil 5.20’de UBC842 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 65 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik doz ve süresi arttıkça bant sayısının arttığı tespit edilmiştir. Örneklerin tamamı UBC842 primerine cevap vermiştir.



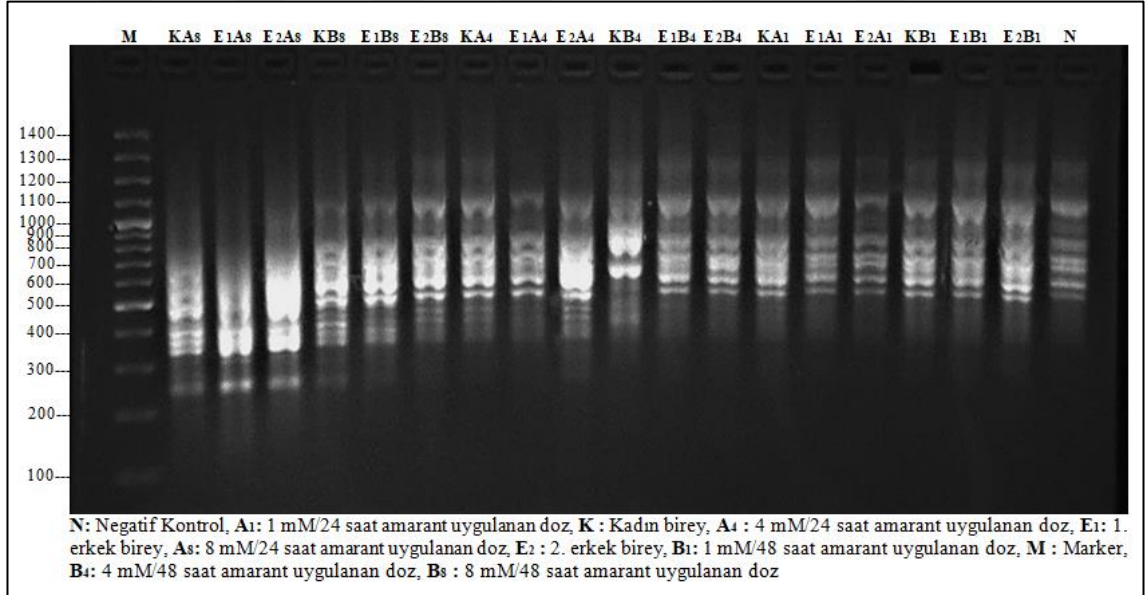
Şekil 5.20. UBC842 primer jel görüntüsü

Şekil 5.21’de UBC899 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte polimorfik bant oluşmadığını göstermiştir.



Şekil 5.21. UBC899 primer jel görüntüsü

Şekil 5.22’de UBC818 primeri ile yapılan ISSR-PCR bantları yer almaktadır. Sonuçlar, 18 örnekte toplam 54 polimorfik bant oluştuğunu göstermiştir. Toksik doz ve süresi arttıkça bant sayısının arttığı tespit edilmiştir. Örneklerin tamamı UBC818 primerine cevap vermiştir.



Şekil 5.22. UBC818 primer jel görüntüsü

5.3.1. ISSR PCR polimorfizm ve GTS analizleri

ISSR PCR ürünlerinin jel görüntüsü incelenerek elde edilen veriler (yeni bant oluşumu/bant kaybolması) ve analiz sonuçları (GTS değeri ve polimorfizm oranı) Tablo 5.3’de yer almaktadır.

Tablo 5.3. ISSR PCR polimorfizm ve GTS tablosu

Primer	K	KB8	E1B8	E2B8	KA8	E1A8	E2A8	KB4	E1B4	E2B4	KA4	E1A4	E2A4	KB1	E1B1	E2B1	KA1	E1A1	E2A1
UBC807	5	+1.297,1	+1.297,1	+1.297,1	+1.296,8	+1.296,8	+1.296,8												
UBC810	4	+327,1	+457,1	+327,1	+327,1	+327,1	+327,1	+327,1	+327,1	+327,1		+457,1	+457,1	+457,1	+457,1		+693,1		-1.253,8
		+457,1	+501,1	+457,1	+657,1	+657,1	+501,1	+457,1	+457,1			+501,1	+501,1	+501,1	+501,1		-1.253,8		
		+501,1	+589,1	+501,1	+501,1	+501,1	+693,1	+501,1	+501,1			+501,1	+501,1	+693,1	+501,1				
		+589,1	-1.253,8	+619,1	+693,1	+693,1	-1.253,8	+693,1	+693,1			+693,1	+693,1	-1.253,8	+589,1				
		-1.253,8		-1.253,8	-1.253,8	-1.253,8		-1.253,8											
UBC812	7	+483,9	+482,9	+482,6	+484,1	+483,5	+482,8	+484,1	+483,7	+484,1	+484,1	+483,1	+484,3	+483,1	+484,5	+482,1	+484,4	+483,6	+484,1
		+297,2	+298,2	+297,6	+298,1	+296,9	+297,4	+298,1	+296,9	+297,3									
UBC816	6	-351,1	+927,1	+913,1	-677,8	+903,1	+904,1												
		-257,9	-351,1	-351,1	-257,9	-351,1	-351,1	+907,1	+906,2	+921,3	-257,9	-257,9	-257,9						
			-257,9	-257,9		-257,9	-257,9												
UBC817	4																		
UBC868	6	+803,5	+801,7	+239,7	+233,6	+232,9	-398,6												
		+244,8	+241,6																
UBC825	4	-986,5	-986,5	-986,5	-986,5	-986,5	-986,5												
		-368,5																	
UBC830	5	+497,8	+402,7	+499,1	+403,5	+405,7	+488,9	+401,2	+623,9	+586,7	-609,7	+402,7	-609,7	+384,3					
		+401,9	+343,6	+495,8	+389,2	+398,5	+407,6	+379,6		+524,1		-1.309,8							
		-1309,8	-1.309,8	+341,6	-1309,8	-1.309,8													
				-1.309,8															
UBC836	5	+1.300,9	+1.301,7	+1.299,8	+1.284,1	+1.293,2	+1.265,1	+1.296,7	+1.283,1	+1.275,3	+347,9	+399,7	+371,6	-652,8	-652,8	-479,8	-652,8	+1.301,2	+756,8
		+1.284,1	+1.291,8	+1.279,6	+1.156,5	+1.149,8	+1.153,3	+798,1	+788,1	+711,6									
		+1.158,7	+1.149,9	+1.157,2	+1.100,8	+1.099,8	+1.103,7												
		+1.100,8	+1.102,8	+1.102,8	-652,8		-652,8												
		-652,8	+1.103,5	-652,8															
UBC840	9	-601,8	-601,8	-601,8															
		-371,1																	
UBC848	4																		

N: Negatif Kontrol, **A1:** 1 mM/24 saat amarant uygulanan doz, **K** : Kadın birey, **A4** : 4 mM/24 saat amarant uygulanan doz, **E1:** 1. erkek birey, **A8:** 8 mM/24 saat amarant uygulanan doz, **E2** : 2. erkek birey, **B1:** 1 mM/48 saat amarant uygulanan doz, **B4:** 4 mM/48 saat amarant uygulanan doz, **B8** : 8 mM/48 saat amarant uygulanan doz

Tablo 5.3. Devam ISSR PCR polimorfizm ve GTS tablosu

Primer	K	KB8	E1B8	E2B8	KA8	E1A8	E2A8	KB4	E1B4	E2B4	KA4	E1A4	E2A4	KB1	E1B1	E2B1	KA1	E1A1	E2A1
UBC856	4	+913,5 +601,9	+603,9	+605,7	+599,8	+601,3	+598,9	-812,9	-812,9	-323,4	+604,6	+603,8	-812,9	-812,9	+607,2	+601,3			
UBC841	6	+521,6 +497,3 +401,6 +376,8	+523,7 +498,5 +403,4 +378,3	+514,8 +463,7 +411,3 +379,2	+517,2 +486,5 +407,2 +387,2	+468,5 +411,3 +391,2 -1213,1	+471,5 +413,2 +389,6	+496,3 +486,2 +372,5	+476,5 +428,1 +379,8	+475,3 +409,5	+481,3 +412,3 +369,9	+491,5 +389,2	+479,3 +387,6	+487,9 +363,2	+491,6 +362,7	+493,7 +388,6	+492,1 +375,2	+487,5	
UBC842	12	-1.398,6 -1.201,9 +997,2 +497,5	-1.398,6 +489,2 +403,2 +398,1	-1.398,6 +491,2 +402,5 +397,1	-1.398,6 +496,5 +403,6 +389,7	-1.398,6 -1.201,9 -1.201,9 +367,8	-1.398,6 -1.297,3 -1.201,9 -318,2	-1.398,6 -1.201,9 +404,5 +392,5	-1.398,6 -1.127,3 +399,7	-1.398,6 +487,9 +405,8 +386,8	-1.398,6 +495,8 +406,5 +391,2	-1.398,6 -1.127,3 -1.201,9 +493,6	-1.398,6 -1.297,3 +403,8	-1.398,6 +704,6 +407,2 +371,8	-1.398,6 +403,8 +396,8 +369,2	-1.398,6 -1.297,3 +387,8 ,	-1.398,6 -1.297,3 +393,5	-1.398,6 -1.297,3	
UBC899	6																		
UBC818	8	-1.203,9 -1.098,7 -897,5 -702,6 +399,8 +367,9 +325,8 +264,5	-1.203,9 -1.098,7 -897,5 -702,6 +397,8 +366,9 +327,8 +262,5	-1.203,9 -1.098,7 -897,5 -702,6 +398,7 +365,7 +326,4 +263,8	-1.203,9 -897,5 +395,8 +361,9 +347,6 +251,2	-1.203,9 -897,5 +413,5 +396,8 +363,4 +348,7	-897,5 +413,5 +398,5 +342,5	-897,5 -1.203,9 -897,5 +476,1 +397,5	-1.203,9 -897,5 +442,9 +386,5	+491,3 +417,8	-897,5 +436,5	-897,5							
Toplam Bant Sayısı	95	42	38	40	34	33	30	22	20	22	13	15	15	13	12	9	9	7	6
GTS Değeri		55,78	60	57,89	64,21	65,26	68,42	76,84	78,95	76,84	86,32	84,21	84,21	86,32	87,37	90,53	90,53	92,63	93,68
Poliforfizm Oranı		44,22	40	42,11	35,79	34,74	31,58	23,16	21,05	23,16	13,68	15,79	15,79	13,68	12,63	9,47	9,47	7,37	6,32

N: Negatif Kontrol, A₁: 1 mM/24 saat amarant uygulanan doz, K : Kadın birey, A₄ : 4 mM/24 saat amarant uygulanan doz, E₁: 1. erkek birey, A₈: 8 mM/24 saat amarant uygulanan doz, E₂ : 2. erkek birey, B₁: 1 mM/48 saat amarant uygulanan doz, B₄: 4 mM/48 saat amarant uygulanan doz, B₈ : 8 mM/48 saat amarant uygulanan doz

6. SONUÇ ve TARTIŞMA

6.1. Sonuç

Yaşadığımız dönemde gıda katkı maddelerine olan talebin artmasıyla tükettiğimiz gıdaların yaklaşık olarak %75'inin yapay gıdalardan oluştuğu belirlenmiştir (Linke vd., 2018). Beslenmemizde yer alan bu gıda katkı maddelerinin içeriğinde ksenobiyotik maddelerin olması ihtimali endişe verici bir durum olarak görülmektedir (Kumar vd., 2019). Gıda katkı maddelerinin en büyük sınıfını oluşturan gıda boyaları, özellikle de azo (N=N) boyalar, gıda sanayisinde uzun süredir kullanılmaktadır (Li vd., 2019).

Yapay olarak üretilen gıda boyalarının vücuda alınması sonucunda sıçanlarda böbrek fonksiyonlarında hasar, hepatotoksisite, anemi, lökopeni, astım sorunları, ürtiker ve enzim aktivitesinde azalma meydana geldiği yapılan deneylerle tespit edilmiştir (Elekima ve Nwachuku, 2019). Gıda boyalarının alerjik, klastojenik, mutajenik, kanserojen olmaları, hiperaktiviteye ve öğrenme bozukluklarına sebep olmaları gibi zararlarından dolayı belirli oranlarda kullanımlarına izin verilmektedir (Büyükdere ve Ayaz, 2017). Katkılı besinleri tüketen bireylerin güvenliğini sağlamak amacıyla biyokimyasal, mutajenik, akut toksisite, genotoksisite testleri gibi çeşitli araştırmalar yapılması gerektiği düşünülmektedir (Balta vd., 2019). Kimyasalların genetik yapılaraya verdiği hasarların belirlenmesinde sadece bir test uygulanmasının yetersiz olduğu, bundan dolayı kimyasalların mutajenik ya da genotoksik zararlarını ortaya koymada birçok testin kullanılmasının zorunlu olduğu araştırmalarda önemle bildirilmiştir (Mortelmans ve Rupa, 2004; Üstün, 2007).

Bu tez çalışmasında, amaranth gıda boyasının insan lenfositleri üzerinde genotoksik etkisinin olup olmadığının belirlenmesiyle, ileride bu alanda yapılacak diğer çalışmalara ışık tutulması ve amaranth sebebiyle oluşabilecek genetik hasarların önlenerek hem günümüz neslinin hem de gelecek nesillerin oluşabilecek gen hasarlarından korunması hedeflenmiştir. Araştırmada amaranth gıda boyasının kullanılmasının nedeni, uzun yıllardır başta gıda endüstrisi olmak üzere; kozmetik, tekstil gibi birçok alanda hayatımıza girmiş olmasıdır (Elwood vd, 2008). Genotoksisite testlerinde periferik insan lenfositlerinin tercih edilmesinin nedeni, kolay temin edilebilmesi, kültürdeki insan lenfositlerinin yüksek sayıda homozigot birey içeren bir popülasyon olarak

görülmesidir. Ayrıca genotoksik maddelere maruz kaldıklarında oluşan bant modellerindeki değişikliklerin test edilen kimyasalın DNA üzerindeki etkilerini yansıtmaktadır (Çulcu vd., 2010). Bunlara ek olarak periferik kan lenfositlerinin sitogenetik analizlerde ve somatik hücrelerde klastojenik ajanlara aşırı maruz kalmanın neden olduğu genetik hasarları saptama çalışmalarında uygun materyal olduğunun düşünülmesidir (Feng vd., 2005; Muranli ve Kaymak, 2008).

Çalışmada in vitro moleküler yöntemlerin tercih edilme nedenlerinden biri; 2007'de NRC'nin (Ulusal Araştırma Konseyi), insan sağlığı risk değerlendirmelerini desteklemek amacıyla toksisite testinin geleceği için bir vizyon ortaya koyan “21. Yüzyılda Toksisite Testi: Bir Vizyon ve Bir Strateji (NRC-NAS, 2007)” başlıklı uzman paneli raporunda, tüm hayvanlar üzerinde yapılan testlerden önce in vitro testlere dayalı yöntemlerin kullanımı için çağrıda bulunmuştur. Bu rapor, insan kaynaklı hücreler, hücre dizileri veya hücresel bileşenler kullanılarak biyolojik süreçlerdeki değişiklikleri değerlendiren yöntemlerin tercih edilmesini öngörmüştür. Rapor ayrıca, hayvan çalışmalarının genellikle tipik insan maruziyeti için beklenenden daha yüksek dozları içerdiğini, dolayısıyla düşük doz maruziyet hakkında varsayımlar gerektirdiğini ve genel popülasyonda tipik olarak meydana gelen düşük doz maruziyeti kullanan toksisite testinin önemli olduğunu belirtmiştir. Moleküler uygulamalar, toksik saldırılara verilen hücresel tepkileri 2 ana yolla anlamamıza yardımcı olmaktadır. Bunlardan birincisi; toksik maddelere düşük dozda maruz kalmanın etkileri, ikincisi ise herhangi bir patofizyolojik etki gözlemlenmeden önce erken hücresel yanıtların saptanmasıdır (Choudhuri vd., 2018).

Yöntem olarak IRAP tekniğinin seçilme nedeni, gen varyasyonlarının analizini güvenilir, doğru ve etkili bir biçimde gerçekleştirebilmesi (Sharma ve Nandineni, 2014; Cheraghi, Rahmani ve Hassanzadeh-Ghorttapeh, 2018), uygulama kolaylığı, tek bir primerle genomdaki tüm bölgelerin taranabilir olması, ekonomik ve tekrarlanabilir olmasıdır (Schulman vd., 2004). Ayrıca IRAP yöntemi, retrotranspozon temelli bir yöntemdir. Retrotranspozonların epigenetik aktivitelerinin genlerin ifadesinde değişimler meydana getirdiği birçok çalışmada raporlanmıştır (Miura vd., 2001). Epigenetik değişikliklerin belirlendiği in vitro ve in vivo test sonuçlarına dayanarak, epigenetik modifikasyonların toksisitenin altında yatan neden olduğunun anlaşılması, bu

modifikasyonların araştırmalarda daha fazla kabul görmesini sağlamıştır. Giderek artan sayıda çalışma, epigenetik modifikasyonların, ksenobiyotik taşıma, metabolizma ve toksisite ile ilişkili genlerin ekspresyonu üzerindeki etkilerini belgelemektedir (Cheng vd ,2012 ; Choudhuri vd., 2010 ; Klaassen vd., 2011).

ISSR tekniėinin seçilme nedeni ise; primerlerinin dűřűk maliyetli olması, çabuk sonuç vermesi, kolaylıkla uygulanabilmesi ve primerlerinin uzun olması sebebiyle doėru sonuç verdiėinin kabul edilmesidir (Bornet ve Branchard, 2001). Ayrıca ISSR primerlerinin, genomda dizi tekrarlarının kaybolması ya da tekrarlar arasındaki mesafenin deėiřmesine neden olan silme, ekleme veya translokasyon gibi mutasyonlar oluřtuėunda polimorfizm üretmesidir (Godwin vd., 1997; Pradeep Reddy vd., 2002; Kesawat ve Das, 2009; Yorgancılar vd., 2015).

Her iki yöntemde meydana gelen polimorfizmler farklı gen bölgelerinde yer almaktadır. Bu da çalışmada çok yönlű veriler elde edilmesine olanak tanımıştır. Tez çalışmasında iki farklı molekűler yöntem kullanılarak bulgular arasında karşılaştırma yapılabilmiş ve böylece doğruluğu daha yüksek sonuçların elde edilebilmesi sağlanmıştır. Ayrıca insan lenfositlerinde daha önce kullanılmamış olan IRAP ve ISSR PCR yönteminin genotoksik risklerin belirlenmesinde kullanılabilir olduğunu göstererek, elde edilen verilerin literatűre katkı sağlaması amaçlanmıştır.

6.1.1. IRAP analiz sonuçları

Amaranth gıda boyası ile muamele edilen 18 lenfosit rneėinde IRAP analizi için uygulanan 5 primerden toplam 145 bant oluřmuřtur. Meydana gelen bantların büyüklűėü 107,5 bp ile 1100,5 bp aralıėında deėiřmektedir. Kullanılan tüm primerlerde polimorfizm tespit edilmiřtir. Polimorfizm 3 bireyin tamamında, tüm dozlarda gözlenmiř olup %41,67 ile %83,33 deėer aralıklarında deėiřmektedir. En yüksek polimorfizmin 5LTR1 ve SIRE1 primerlerinde, en dűřűk polimorfizmin Sukkula primerinde meydana geldiėi belirlenmiřtir. Örneklerin GTS deėerlendirmesinde uygulanan amaranthın doz artıřı ve uygulanma sűresiyle ters orantılı olarak GTS oranının azaldıėı, polimorfizm oranının arttıėı belirlenmiřtir. Amaranth gıda boyasının 8 mM'lık ve 48 saat sűreyle uygulanan dozlarda en yüksek genotoksisiteye, 1 mM'lık 24 saat uygulanan dozlarda ise en dűřűk genotoksisiteye sebep olduėu tespit edilmiřtir.

IRAP ürünlerinin jel görüntülerinde oluşan/eksilen bantlar retrotranspozonların aktifleştğini yani genotoksik bir durumun oluştuğunu ifade etmektedir. Elde edilen tüm veriler, IRAP yönteminin insan numunelerinde genotoksisite çalışmalarında kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

6.1.2. ISSR analiz sonuçları

Amaranth gıda boyası ile muamele edilen 18 lenfosit örneğinde ISSR analizi için uygulanan 16 primerden toplam 386 bant oluşmuştur. Meydana gelen bantların büyüklüğü 232,87 bp ile 1297,13 bp aralığında değişmektedir. Kullanılan primerlerden UBC817, UBC848 ve UBC899’de polimorfizm tespit edilmemiştir. Diğer 13 primerde polimorfizm 3 bireyin tamamında gözlenmiş olup bazı primerlerde sadece en yüksek dozlarda oluştuğu tespit edilmiştir. Polimorfizm oranları %6,32 ile %44,22 değer aralıklarında değişmektedir. En yüksek polimorfizmin UBC818 ve UBC842 primerlerinde, en düşük polimorfizmin UBC807 ile UBC825 primerinde meydana geldiği belirlenmiştir. Örneklerin GTS değerlendirmesinde uygulanan amaranthın doz artışı ve uygulanma süresiyle ters orantılı olarak GTS oranının azaldığı, polimorfizm oranının arttığı belirlenmiştir.

Amaranth gıda boyasının 8 mM’lık ve 48 saat süreyle uygulanan dozlarda en yüksek genotoksisiteye, 1 mM’lık 24 saat uygulanan dozlarda ise en düşük genotoksisiteye sebep olduğu tespit edilmiştir.

ISSR ürünlerinin jel görüntülerinde oluşan/eksilen bantlar olması genomun optimum durumdan uzaklaştığını yani genotoksik bir durumun oluştuğunu ifade etmektedir. Elde edilen tüm veriler IRAP yönteminde olduğu gibi ISSR yönteminde insan numunelerinde genotoksisite çalışmalarında kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

6.2. Tartışma

Gıda boyalarının insan sağlığını tehdit ettiği, özellikle de geleceğimiz olan çocukların hem fiziksel hem de zihinsel gelişimleri üzerinde çok ciddi sorunlar oluşturduğu düşünülmektedir. Doğuş ve arkadaşlarının (2021) yapmış olduğu çalışma bu düşüncüyü desteklemektedir. Deneylerinde, yapay gıda renklendiricilerine doğum öncesi maruz

kalmanın nörodavranış üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla hamile sıçanlara sırasıyla eritrosin, ponceau 4R, allura kırmızı, gün batımı sarısı, tartrazin, amaranth, parlak mavi, azorubin ve indigotin uygulanmıştır. Sentetik boyaların doğan yavruların hipokampusunda yer alan öğrenme ve hafıza bölgesindeki protein seviyelerini değiştirdiği saptanmıştır. Bu reseptörler sıçanlarda olduğu gibi çocukların da öğrenme ve hafıza bölgesinde bulunmaktadır. Deneysel bulgular, boyalara maruz kalan sıçan yavrularının uzamsal öğrenme ve hafızasında değişiklik oluşturmada, düşük motivasyon ve artan umutsuzlukla ilgili davranışlar sergilediklerini göstermiştir. Sonuçlar, gıda boyalarına doğum öncesi maruz kalmanın, glutamaterjik sinyalleşmede ergenliğe kadar devam edebilecek cinsiyete bağlı değişikliklere yol açabileceğini göstermiştir.

İçöz ve arkadaşları (2008) yapmış oldukları çalışmada, hücrelerin canlılığını tespit etmeyi esas alan MTS (5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4,5-dimetil-tiyazol) -3- (4-sülfofenil) tetrazolyum, iç tuz deneyi) testini kullanarak new coccine, amaranth, rose bengal, tartrazin, allura red ve phloxine yapay gıda renklendiricilerinin toksisite düzeylerini belirlemiştir. Deneyde kullanılan boyaların her birinin 1 mM hazırlanmış dozları ile CHO (Chinese hamster ovary) hücreleri inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen bulgulara göre allura red, eritrosin, Rose Bengal, amaranth ve Phloxine sentetik renklendiricilerin kontrol ile karşılaştırıldığında hücrenin canlılığı üzerine önemli ölçüde toksik olduğu belirlenmiştir. Bu deneyde kullanılan 1 mM'lık doz, çalışmamızda en düşük konsantrasyon olarak uygulanmıştır. Çalışma bulgularımız bu araştırma verileriyle uyumlu olarak hem IRAP hem de ISSR yönteminde oluşan bantlar 1 mM'lık dozlarda da polimorfizm göstermiş ve genotoksik etki olduğu anlaşılmıştır.

Sarıkaya ve arkadaşları (2012); beş gıda boyasının genotoksik etkisini (amaranth, patent mavisi, karminik asit, indigotin ve eritrosin) *Drosophila melanogaster*'de SMART uygulayarak değerlendirmiştir. Yöntemde farklı dozlarda gıda boyaları, *Drosophila melanogaster*'in larvalarına besin olarak verilmiştir. Hayatta kalan larva yavrularının gelişmesi ile ortaya çıkan yetişkin sineklerin kanatları, mutant hücre lekelerinin varlığı açısından puanlanıp kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda 12,5; 25 ve 50 mg/ml olan amaranth konsantrasyonunda SMART pozitif sonuçlar verdiği

belirlenmiştir. Analiz bulguları tez çalışmamızla uyumlu olarak amaranthın genotoksik etki meydana getirdiğini göstermiştir.

Amaranthın DNA'ya bağlanarak kromozom anormalliklerine neden olduğu 2010 yılında Mpountoukas ve arkadaşlarının yaptıkları deney ile ortaya konmuştur. Bu araştırmada insan periferik kan hücreleri amaranth gıda boyasına maruz bırakılarak amaranthın genotoksik etkisi, KKD, Proliferating Rate Index (PRI) ve Mitotik Index (MI) analizleri ile belirlenmiştir. Çalışma bulguları amaranth boyasının 8 mM'lık dozlarında, hücrelerde mitotik indeksi azalttığı, hücre bölünmesinde gecikmeler oluşturduğu ve bu hücrelerde harabiyete sebep olup mikronükleus oluşumunu tetiklediğini göstermiştir. Bu çalışmada araştırmacıların uygulamış olduğu en yüksek doz bizim çalışmamızda da en yüksek konsantrasyon olarak kullanılmıştır ve 8 mM'lık dozlarda en yüksek polimorfizm gözlenmiştir. Ancak bu verilere ek olarak araştırmada uygulanan 4 mM ve 1 mM'lık konsantrasyonlarda mikronükleus oluşumu gözlenmezken bu deneyde her iki yöntemde de 4 mM ve 1 mM'lık dozlarda polimorfizm gözlenmiş ve GTS değeri düşmüştür. Bu bulgular doğrultusunda ISSR ve IRAP yönteminin daha düşük konsantrasyonlardaki toksik ajanlara maruziyetlerde bile yaşanan gen harabiyetlerine karşı duyarlı testler olabileceği kanaatine varılmıştır.

Gıda ve ilaç endüstrisindeki uzun geçmişi nedeniyle amaranth ile ilgili literatürde çok sayıda eski ve yeni araştırma bulunmaktadır (Combes ve Haveland-Smith, 1982; Leconite ve Lesca, 1978). Bunlardan bazıları, model organizma olarak *Drosophila melanogaster* (Semerdöken, 2012) ve bitkilerde *Vicia faba* (bakla)'da (Yemiş,2020), *Allium cepa* L. (soğan) kök ucu hücrelerinde mitotik indeks ve mikronükleus testi (Gomes, vd. 2013), insan lenfositlerinde KKD, mitotik indeks (Mpountoukas vd., 2010) ile yapılan deneylerden oluşmaktadır. Amaranthın bakteriler üzerinde genotoksik etkisinin olmadığını belgeleyen bir çok araştırma da mevcuttur (Brown vd., 1978; Haveland-Smith ve Combes, 1980; Chung vd., 1981; Das ve Mukherjee, 2004). Bununla birlikte, çalışılan in vivo testlerin bazılarında hala belirsiz ve tutarsız veriler bulunmaktadır (Sasaki vd., 2002). 8 fare organı üzerinde comet testiyle yapılan 24 saatlik tek doz tedavisinin ardından, izin verilen günlük alımdan (2000 mg/kg vücut ağırlığı) daha düşük dozlarda bile, amaranthın üç farklı organda genotoksik hasar oluşturduğu belirlenmiştir (Yu vd., 2002). Benzer bir çalışmadan elde edilen veriler,

destekleyici nitelikte olmasına rağmen, fareler ve sıçanlarda gelişen bu toksisitenin türler arasında farklılık gösterebileceği de düşünülmektedir (Shimadaet, 2010). Bunun yanı sıra 24 saat arayla çift dozlama yapılan farelerin bağırsak dokusunun mikronükleus testi ile incelenmesi sonucunda amaranthın mutajenik olmadığı ve kontrole göre mikro çekirdekli hücre sıklığında önemli bir artış olmadığı raporlanmıştır (Sasaki vd., 2000). Sıçanların mide, kolon ve kemik iliğinin mikronükleus analizini içeren başka bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Okada vd., 2013). Amaranthın in vivo kemik iliği testi kullanılarak genotoksitesinin araştırıldığı bir çalışmada kromozomal sapmaları tetiklemediği bildirilmiştir (Das ve Mukherjee, 2004).

Amaranthın insanlar üzerindeki genotoksik etkisini belirlemek için yapılan araştırmaların az sayıda olduğu düşünülmektedir (Yemiş, 2020). Bu sentetik gıda boyasının insanlarda kanserojen olduğunu doğrulamak için yeterli kanıt olmaması nedeniyle hala bir insan kanserojeni olarak tanımlanmamıştır. Ayrıca, gıda boyaları ve katkı maddeleri için bu tür sınıflandırmaların yapılabilmesi, toksisite veya sebep olunan diğer tahribatlar konusunda kesin kanıtlar elde edilmesiyle mümkün olmaktadır. Bu kesin kanıtlar için daha büyük numune boyutlarıyla ve daha kapsamlı testlerin yapılması gerekmektedir (Thomas ve Adegoke, 2015). Amaranth, Avrupa birliği ve FDA tarafından kullanımına izin verilen, ABD’de yasak ancak Türkiye’de kullanımı yasal olan sentetik bir gıda boyası olarak, gıda sektöründe yer almaya devam etmektedir (Saldamlı ve Uygun, 2007).

Genetik toksisite düzeyi ve mutajenlerin insanlar üzerindeki etkilerinin incelenmesi için, bakteriler, çeşitli memeli hücreleri, *Drosophila melanogaster* ve bitkilerin kullanılmasının yanı sıra en yaygın kullanılan test materyalinin insan lenfosit hücreleri olduğu bilinmektedir (Doak vd, 2012; Soltani vd., 2009).

İnsan lenfositleri kullanılarak yapılan genetik ve epigenetik çalışmalarda moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu çalışmalardan;

Çulcu ve arkadaşlarının yaptıkları (2010) çalışmada; fiziksel ve kimyasal mutajenlerin insanlar üzerindeki genotoksik etkilerini belirlemek amacıyla toksik olduğu kesin olarak bilinen 4 madde ile muamele edilen periferik kan lenfositleri ve mutajenle teması olmayan kontrol grubu lenfosit hücreleri kullanılarak RAPD tekniği uygulanmıştır.

Deneysel bulgular, kontrol grubu ile kıyaslandığında toksik ajana maruz bırakılan lenfositlerin RAPD profillerinde polimorfik bantlar oluşturduğunu saptamıştır. Sonuç şunu göstermiştir ki, insanlar için tehlikeli maddelerin saptanmasında, periferik kan lenfositleri ve RAPD yöntemi birlikte başarılı bir şekilde çalışılabilmektedir.

Yüzbaşıoğlu ve arkadaşları (2021); gıda ve ilaç endüstrisinde sıklıkla kullanılan Pullulan'ın mitomisin C'ye karşı genotoksik ve antigenotoksik etkisini belirlemek için, insan lenfositleri kullanarak RAPD-PCR yöntemi ve beraberinde üç farklı teknik (Mikronükleus (MN), mikronükleus-FISH (MN-FISH), Comet test) uygulamışlardır. Deneysel bulgular değerlendirildiğinde Pullulan'ın genotoksik olmadığı ve hücreleri mitomisin C'ye karşı koruyarak antigenotoksik etki gösterdiği anlaşılmıştır. Bununla birlikte tüm veriler RAPD tekniği ile birlikte kullanılan diğer üç tekniğin, birbirini destekleyici yönde uyumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir. Bu çalışmada materyal olarak seçilen insan lenfositleri, 4 yöntemin tamamında başarıyla kullanılmıştır.

Monosodyum glutamatın insan lenfositleri üzerinde meydana getirdiği genotoksik etki, KA, KKD, sitokinez bloke mikronükleus (CBMN), Comet testi ve RAPD-PCR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışma sonucunda, monosodyum glutamatın altı farklı konsantrasyonuna maruz bırakılarak inkübe edilen izole insan lenfositlerinde, doz artışına bağlı olarak genotoksisitenin arttığı bildirilmiştir (Ataseven vd., 2016). Araştırma bulguları, insan lenfositleri üzerinde çalışılan 5 yöntemde birbirini destekleyici nitelikte sonuçlar verdiğini göstermiştir.

Sudprasert ve arkadaşları (2006); belirli mesleklerde çalışan ve gama radyasyonuna maruz kalan bireylerde oluşan olumsuzlukların, biyolojik ve sağlık üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla, düşük doz gama radyasyonuna maruz kalan insanlardan alınan tam kan ve periferik lenfositleri üzerinde araştırma yapmıştır. Bu çalışmada gama radyasyonunun DNA hasarı, KA ve DNA onarım gen ekspresyonları üzerindeki etkilerini saptamışlardır. Sonuçlar, gama radyasyonunun DNA hasarı üzerinde doza bağlı olarak çeşitli şekillerde genotoksisite oluşturduğunu göstermiştir.

Bakır oksiklorürün 3 farklı konsantrasyonuna maruz bırakılmış insan lenfositlerinde oluşan genotoksisitenin, KA, MN testi ve RAPD-PCR yöntemi kullanılarak belirlenmesi planlanmıştır. Bu çalışmada in vitro laboratuvar ortamında bakır

oksiklorürün insan lenfositleri için, doz artışına paralel olarak genotoksik potansiyele sahip olduğu raporlanmıştır (Bayram vd., 2016). İnsan lenfositleri her 3 yöntemde de materyal olarak tercih edilmiştir.

Bal ve arkadaşlarının (2018) çalışmasında; kültürlenmiş insan periferik kan lenfositlerinde arseniğin neden olduğu oksidatif hasara karşı anetolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Arseniğin meydana getirdiği genotoksik etki, KKD frekansı, kuyruk moment, lipid peroksidasyon seviyesi ve RFL tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda arsenik dozunun artışıyla beraber genotoksisite riskinin arttığı, ancak anetolün, sodyum arsenit ile kombinasyonu halinde ise SCE'lerin sıklığında, kuyruk momentinde ve lipid peroksidasyon seviyelerinde doza bağlı anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir. Bulgular, insan lenfositlerinin genotoksisite ve antigenotoksisite araştırmalarında uygun materyal olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Literatüre yer alan bir çok çalışma (Çulcu vd., 2010; Yüzbaşıoğlu vd., 2021; Ataseven vd., 2016; Sudprasert vd., 2006; Bayram vd., 2016; Bal vd., 2018), genomik kararsızlıkların saptanması amacıyla yapılan araştırmalarda insan lenfositlerinin başarılı bir şekilde kullanılabildiğini göstermektedir. Tez çalışmasında materyal olarak seçtiğimiz insan lenfositleri bu çalışmalarla uyumlu olarak başarıyla kullanılmıştır.

Genel olarak tez araştırmamızda kullandığımız ISSR ve IRAP yöntemi ile elde edilen bulgular ile amaranth boyasının farklı teknikler kullanılarak daha önce yapılmış bazı çalışma bulguları arasında birbiriyle uyumlu sonuçlar olduğu gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, kullandığımız her iki yönteminde insan lenfositlerinde genotoksisite çalışmalarında güvenilir ve doğru sonuçlar verebileceği kanaatine varılmıştır. Ancak ISSR primerleri IRAP primerlerine göre tüm numunelerde daha iyi sonuç vermiştir. IRAP analizlerinde tüm dozlarda bant değişimleri gözlenirken ISSR yönteminde kullanılan 3 primerde bant değişimi olmayıp, 8 primerde ise düşük dozlarda, polimorfik bant izlenmemiştir. Yüksek dozla muamele edilen örneklerin tamamında ise polimorfik bant tespit edilmiştir.

Kepekçi ve arkadaşları (2019); HERV polimorfizmleri ile nazal polip oluşma riski arasında ilişki olup olmadığını belirlemek amacıyla insandan alınan nazal sürüntü örneklerini IRAP PCR yöntemiyle analiz etmiştir. Çalışma sonucunda polimorfizm

tespit edilmemiştir. Ancak IRAP yönteminin insan nazal sürüntü örneklerinde kullanılabilir olduğu belirtilmiştir. Araştırmamızda ilk kez insan lenfositlerinde kullanılan IRAP yönteminde Kepekçi ve arkadaşlarının yaptığı deneyle uyumsuz olarak toksik dozlarda polimorfik bantlar gözlenmiş ve genotoksik etki saptanabilmiştir.

Anderson ve arkadaşlarının (2001) “İnsan Sporadik Kolorektal Kanserde İntrakromozomal Genomik Kararsızlık” konulu çalışmasında, cerrahi rezeksiyon yapılan hastalardan elde edilen 59 kanserli dokulara ve kontrol grubu olarak sağlıklı dokulardan izole edilen DNA'lara ISSR PCR yöntemi uygulanıp, PCR ürünleri Agaroz jelde görüntülenmiştir. Kanserli doku ile normal doku karşılaştırıldığında, normal olan dokuda bir bantın eksik olduğu belirlenmiştir. Bu bantın klonlanması ve sekanslanması, KIAA0602 (GenBank) sekansının kimliğini ortaya çıkarmıştır. G57-2 olarak adlandırılan bu bantın tümöre özgü olarak oluştuğu ve 13. kromozom üzerinde yer aldığı tespit edilmiştir. ISSR tekniği insan kolorektal tümörlerinde genomik kararsızlığın tahmin edilmesini sağlamış, bununla birlikte, genomik olayların nerede meydana geldiğininde kolayca ortaya çıkarmıştır. Tez çalışmamızda kullandığımız ISSR yöntemi verilerinde toksik doz artışıyla bağlantılı olarak polimorfik bantlar elde edilmiştir. Oluşan polimorfik bantlar DNA'da hasar oluştuğunu göstermektedir. Bu çalışma ile deneyimiz arasında uyumlu sonuçlar oluşmuştur. Her iki çalışmada da DNA bozulmaları, farklılaşan ISSR bant görüntüleri ile tespit edilebilmiştir.

Toksikolojinin asıl hedefi insan, hayvan ve çevre sağlığını korumaktır. Bu nedenle, sağlığın ve hastalığın moleküler temelleri ve çevresel stres faktörlerinin bunları nasıl etkilediği konusundaki ilerlemeler, risk değerlendirmesine yönelik yenilikçi, bilgili ve daha verimli yaklaşımların geliştirilmesini sağlamaktadır (Choudhuri vd., 2018). Gelecekte insan numunelerinde yapılacak ISSR ve IRAP çalışmaları için, kullandığımız primerlere ek olarak farklı ISSR ve IRAP primerlerinin denenmesi ve en yüksek polimorfizme sahip olan primerlerin belirlenip yeni genotoksisite araştırmalarına dâhil edilmesinin bilim dünyasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Polimorfizm gösteren bantların hangi kromozoma ait olduğunu belirleyen ek araştırmaların (sekanslama, gen bankası vb.) yapılması sonucunda, bu gen bölgelerinin sebep olduğu hastalık, tümör ya da anormalliklerin saptanmasının in vitro genotoksisite çalışmalarını, daha detaylı ve anlamlı sonuçlara ulaştıran bir test düzeyine taşıyacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akgün, Ü. (2018) “Faklı dozlarda UV-C radyasyon ışığına maruz bırakılan buğday (*Triticum aestivum*) bitkisinin dna metilasyon seviyelerinin moleküler yöntemlerle ölçülmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzincan, 1-85.
- Alayeb, S.O. (2021) “Health Effects of Environmental Pollutants on Workers in Libyan Plastics Factories, Part B: Based on Molecular Level Properties”, **Journal of Marine Sciences and Environmental Technologies**, 7(2), E26-38.
- Albertini, R.J. (2001) “HPRT mutation in humans: biomarkers for mechanistic studies”, **Mutation Research**, 489(1), 1-16.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000) “IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans”, **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, 463(2), 111-172.
- Alkaya, A. (2021) “Tekstil Endüstrisinde kullanılan reaktif Red 195 boyasının Per-tabanlı moleküler yöntemlere genotoksik etkilerinin incelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Bilecik, 44-48.
- Anderson, G.R., Brenner, B.M., Swede, H., Chen, N., Henry, W.M., Conroy, J.M., ... & Stoler, D.L. (2001) “Intrachromosomal genomic instability in human sporadic colorectal cancer measured by genome-wide allelotyping and inter-(simple sequence repeat) PCR”, **Cancer Research**, 61(22), 8274-8283.
- Anwar, W.A., Salama, S. I., Serafy, M.M.E.I., Hemida, S. A. and Hafez, A.S. (1994) “Chromosomal Aberrations and Micronucleus Frequency in Nurses Occupationally Exposed to Cytotoxic Drugs”, **Mutagenesis**, 9(4), 315-317.
- Ataseven, N., Yüzbaşıoğlu, D., Keskin, A. Ç., & Ünal, F. (2016) “Genotoxicity of monosodium glutamate”, **Food and Chemical Toxicology**, 91, 8-18.
- Atienzar, F.A., Conradi, M., Evenden, A.J. Jha, A.N. and Depledge, M.H. (1999) “Qualitative assessment of genotoxicity using random amplified polymorphic DNA: comparison of genomic template stability with key fitness parameters in *Daphnia magna* exposed to benzo pyrene”, **Environ. Toxicol. Chem.**, 18, 2275-2282.
- Atlı B. (2010), “Gıda Boyaları”, Yüksek Lisans Tezi, **Namık Kemal Üniversitesi**, Tekirdağ, 1-74.
- Bal, S., Yadav, A., Verma, N., Gupta, R., & Aggarwal, N. K. (2018) “Shielding effect of anethole against arsenic induced genotoxicity in cultured human peripheral blood lymphocytes and effect of GSTO1 polymorphism”, **3 Biotech**, 8(5), 1-8.

- Balta, I., Sevastre, B., Mireșan, V., Taulescu, M., Raducu, C., Longodor, A.L., Marchiș, Z., Mariș, C.S., Coroian, A. (2019) “Protective effect of blackthorn fruits (*Prunus spinosa*) against tartrazine toxicity development in albino Wistar rats”, **BMC Chemistry**, 13(1), 104.
- Baruah, J., Pandey, S. K., Begum, T., Sarma, N., Paw, M., Lal, M. (2019) “Molecular diversity assessed among the high dry rhizome rescue Ginger germplasm (*Zingiber officinale* Roscoe) from NE-India using the markers RAPD and ISSR”, **Industrial Crops and Products**, 129 , 463-471.
- Bateman, B., Warner, J. O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, J., Grundy, J., Fitzgerald, C., Stevenson, J. (2004). “The effects of double blind placebo controlled, artificial food colorings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children”, **Archives of Disease Childhood**, 89(6), 506-511.
- Bayram, S., Genc, A., Buyukleyla, M., Rencuzogullari, E. (2016) “Genotoxicity and cytotoxicity of copper oxychloride in cultured human lymphocytes using cytogenetic and molecular tests”, **Cytotechnology**, 68(5), 2027-2036.
- Becerril, C., Acevedo, H., Ferrero, M., Sanz, F., Castano, A. (2001) “DNA fingerprinting comparison of Rainbow Trout and RTG-2 line using random amplified polymorphic DNA”, **Ecotoxicology**, 10(2), 115- 124.
- Belancio, V. P., Hedges, D. J., Deininger, P. (2008) “Mammalian non-LTR retrotransposons: for better or worse in disease and health”, **Genome research**, 18(3) , 343-358.
- Bernet, G.P., Mestre, P.F., Pina, J.A., Asíns, M.J. (2004) “Molecular Discrimination of Lemon Cultivars”, **HortScience**, 39(1), 165–169.
- Bolognesi, C. and Fenech, M. (2013) “Micronucleus assay in humancells: lymphocytes and buccal cells”, **Methods in Molecular Biology**, 1044, 191-207.
- Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E., Norppa, H. (2000) “Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancerindependently of exposure to carcinogens”, **European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. Cancer Research**, 60(6), 1619-1625.
- Brown, J.P., Roehm, G.W., Brown, R.J. (1978) “Mutagenicity testing of certified food colors and related azo, xanthene and triphenylmethane dyes with the Salmonella/microsome system”, **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 56(3),249-271.
- Brown, M. A. and De Vito, S.C. (1993) “Predicting azo dye toxicity”, **Critical reviews in environmental science and technology**, 23(3),249-324.

- Bulut, H. (2018) “Termik santral kaynaklı ağır metallerin mısır ve ekmeklik buğdayda meydana getirdiği moleküler etkilerin belirlenmesi”, Doktora Tezi, **Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzincan, 43-44
- Bulut, H., Yıldırım Doğan, N., Korkmaz, M. (2019) “Tıbbi ve Aromatik Bitki Olarak Kullanılan *Tanacetum sp.*(Pire otu) Türlerinin Genetik Benzerliğinin Moleküler Yöntemler ile Belirlenmesi”. **Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences**, 9(1), 22-29.
- Büyükdere Y. ve Ayaz A. (2017), “Gıdalarda kullanılan renklendiricilerin sağlık yönü: Dikkat eksikliği/ hiperaktivite bozukluğu”, **Beslenme ve Diyet**, 44(2), 169-177.
- Büyükleyla, M. (2013) “Gıda katkı maddesi sodyum metabisüfit’in genotoksik etkisinin RAPD-PCR ile araştırılması”, Doktora tezi, **ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü**, Adana, 33-37.
- Cai, Q., Guy, C.L., Moore, G.A. (1996) “Detection of cytosine methylation and mapping of a gene influencing cytosine methylation in the genome of Citrus”, **Genome**, 39, 235-242.
- Chakraborty, R. (1981) “The distribution of the number of heterozygous loci in an individual in natural populations”, **Genetics**, 98(2), 461.
- Chen, R., Rabinovitch, P.S., Crispin, D.A., Emond, M.J., Bronner, M.P., & Brentnall, T.A. (2005) “The initiation of colon cancer in a chronic inflammatory setting”, **Carcinogenesis**, 26(9), 1513-1519.
- Cheng, T. F., Choudhuri, S., Muldoon-Jacobs, K. (2012) “Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: a review of the literature”, **Journal of Applied Toxicology**, 32(9), 643-653.
- Cheraghi, A., Rahmani, F., and Hassanzadeh-Ghorttapeh, A. (2018) “IRAP and REMAP based genetic diversity among varieties of *Lallemantia iberica*”, **Molecular biology research communications**, 7(3), 125–132.
- Choudhuri, S., Cui, Y., Klaassen, C.D. (2010) “Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences”, **Toxicology and applied pharmacology**, 245(3), 378-393.
- Choudhuri, S., Patton, G. W., Chanderbhan, R. F., Mattia, A., Klaassen, C.D. (2018) “From classical toxicology to Tox21: some critical conceptual and technological advances in the molecular understanding of the toxic response beginning from the last quarter of the 20th century”, **Toxicological Sciences**, 161(1), 5-22.
- Choy, W.N. (Ed.) (2001) “Genetic toxicology and cancer risk assessment”, **New York: Marcel Dekker**, 29-187.

- Chung, K.T. and Cerniglia, C.E. (1992) "Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships", *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277(3), 201-220.
- Chung, K.T., Fulk, G.E., Andrews, A.W. (1981) "Mutagenicity testing of some commonly used dyes", *Applied and Environmental Microbiology*, 42(4), 641-648.
- Clements, J. (2000) "The Mouse Lymphoma Assay", *Mutation Research*, 455, 97-110.
- Clode, S.A., Hooson, J., Grant, D., Butler, W.H. (1987) "Long-term toxicity study of amaranth in rats using animals exposed in utero", *Food and Chemical Toxicology*, 25(12), 937-946.
- Combes, R.D. and Haveland-Smith, R.B. (1982) "A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes", *Mutation Research/Reviews in genetic toxicology*, 98(2), 101-243.
- Çakmak Güner, B. (2018) "İnsan genomunda retrotranspozon ve endojen retrovirüs analizleri", Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı*, İstanbul, 68-77.
- Çakmak, G. (2000), "Trafik Polisi ve taksi sürücüleri hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-107.
- Çelik, M. (2003) "Dinocap fungusunun *Allium cepa* L. kök ucu hücreleri ve insanperiferik lenfositlerinde sitogenetik etkileri", Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-102.
- Çulcu, T. (2007) "İnsan Hücrelerindeki DNA Hasar Ve Mutasyonlarının RAPD Tekniği Kullanılarak Araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir, 37-44.
- Çulcu, T., Sözen, E., Tüylü, B.A. (2010) "Determination of genotoxicants-induced DNA damage by using RAPD-PCR in human peripheral blood lymphocytes", *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(10), 2205-2209.
- Das, A. and Mukherjee, A. (2004) "Genotoxicity testing of food colours amaranth and tartrazine", *International Journal of Human Genetics*, 4(4), 277-280.
- Dilmen, Ö. (2017) "Tuzluluk stresinin buğdayda (*Triticum aestivum* L.) meydana getirmiş olduğu retrotranspozon polimorfizmi üzerine salisilik asitin etkisinin belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı*, Erzurum, 67-72.
- Doak, S. H., Y. Liu, C. Chen (2012) "Genotoxicity and Cancer. Adverse Effects of Engineered Nanomaterials 1st ed., Edited by Fadeel B, Pietroiusti A, Shvedova A.", *Academic Press*, USA, 243-261.

- Doğuç, D.K, Deniz, F., İlhan, İ., Ergonul, E., Gültekin, F. (2021) “Prenatal exposure to artificial food dyes, sampling NM receptor subunits in the hippocampus”, **Nutritional Neuroscience**, 24(10), 784-794.
- Edlefsen, M. and Brewer M.S. (1996) “EHE-756 document, Illinois Cooperative Extension Service”, **University of Illinois at Urbana**, 50-58.
- Elekima, I., Nwachuku, O.E. (2019) “Evaluation of acute and chronic toxicity of tartrazine (E102) on steroid reproductive hormones of albino rats”, **Asian Journal of Research and Reports in Endocrinology**, 1-15.
- Ellwood S.R., Phan H. T. T., Jordan M., Hane J., Torres A. M., Avila C. M., Izquierdo C. S., Oliver R. P., (2008), "Construction of a comparative genetic map in faba bean (*Vicia faba* L.); conservation of genome structure with *Lens culinaris*.", **BMC Genomics**, 9(380), 1-11.
- Erden Çalışır, Z. ve Çalışkan, D. (2003) “Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri”, **Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi**, 32(3) 193-206
- Ertuğrul, F. ve Koç, İ., (2011) “Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler”, **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 2011(2).
- Evans, H.J. (1984) “Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests”, **In Handbook of mutagenicity test procedures**, 405-427.
- Faqi, A.S. (Editor). (2017) “Genetic Toxicology Testing”, **United States: Academic Press**, 136-137.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Peng, P., Zeng, E. Y. (2005) “ Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests”, **Ecotoxicology and environmental safety**, 61(2), 239-246.
- Finnegan, D. J. (1989) “Eukaryotic transposable elements and genome evolution”, **Trends in genetics**, 5, 103-107.
- Fletcher, H., Hickey, I. (2013) “Genetics”, **Garland Science**, London.
- Föllmann, W., Degen, G., Oesch, F., & Hengstler, J. G. (2013) “AMES Test”, **Brenner’s Encyclopedia of Genetics: Second Edition**, 104-107
- Godwin, I.D., Aitken, E.A., Smith, L.W. (1997) “Simple sequence repeat (ISSR) is referred to plant genetics”, **Electrophoresis**, 18(9), 1524-1528.
- Gomes, K.M.S., Oliveira, M.V.G.A.D., Carvalho, F.R.D.S., Menezes, C.C., Peron, A.P. (2013) “Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tartrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells”, **Food Science and Technology**, 33(1), 218–223.

- Gökmen, H. and Köksal, G. (2001) “Bebek beslenmesinde yağ aşitlerinin önemi”, **Beslenme ve Diyet Dergisi**, 30(1), 35-44.
- Graf, U., Abraham, S.K., Guzman-Rincon, J., Wurgler, F.E., (1998) “Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*”, **Mutation Research**, 402(1-2), 203-209.
- Gupta, S. K., Souframanien, J., Reddy, K. S. (2015) “Validation of molecular markers linked with yellow mosaic virus disease resistance in diverse genetic background of black gram (*Vigna mungo*)”gup. **Electronic Journal of Plant Breeding**, 6(3), 755-763.
- Haveland Smith, R.B. and Combes, R.D. (1980) “Screening of food dyes for genotoxic activity”, **Food and cosmetics toxicology**, 18(3), 215-221.
- Hong, Y., Guo, J., Xu, Z., Mo, C., Xu, M., & Sun, G. (2007) “Reduction and partial degradation mechanisms of naphthylaminesulfonic azo dye amaranth by *Shewanella decolorationis* S12”, **Applied microbiology and biotechnology**, 75(3), 647-654.
- Huang, C.R.L., Burns, K.H., Boeke, J.D. (2012) “Active transposition in genomes”, **Annual review of genetics**, 46, 651-657.
- Huang, J., Zhang, K., Shen, Y., Huang, Z., Li, M., Tang, D., Gu, M., Cheng, Z. (2009) “Identification of a High Frequency Transposon Induced by Tissue Culture in *Oryza sativa*, a Member of the hAT Family in Rice”, **Genomics**, 93, 274-281.
- Ikken, Y., Cambero, I., Marin, M. L., Martinez, A., Haza, A. I., Morales, P. (1998) “Antimutagenic effect of fruit and vegetable aqueous extracts against N-nitrosamines evaluated by the Ames test”, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 46(12), 5194-5200.
- İçöz, A., Demirkol O., Çağrı Mehmetoğlu A. (2008) “Çeşitli Gıda Boyalarının Hücre Canlılığı üzerine etkisinin MTS Testi Kullanılarak Belirlenmesi”, **Araştırma Makalesi (Research Article)**, Gıda, 33(6), 275-279
- Jain, A.K., Singh, D., Dubey, K., Maurya, R., Mittal, S., Pandey, A.K. (2018) “Models and methods for in vitro toxicity”, **In Vitro Toxicology**, 45-65.
- Jiang, L.L., Li, K., Yan, D.L., Yang, M.F., Ma, L., Xie, L.Z. (2020) “Toxicity assessment of 4 azo dyes in zebrafish embryos”, **International Journal of Toxicology**, 39(2), 115-123.
- Jiang, N., Bao, Z., Temnykh, S., Cheng, Z., Jiang, J., Wing, R.A., McCouch, S.R., Wessler, S.R. (2002) “Dasheng: A Recently Amplified Nonautonomous Long Terminal Repeat Element that is a Major Component of Pericentromeric Regions in Rice”, **Genetics**, 161(3), 1293-1305.
- Juhlin L., Michaëlsson G., Zetterström O. (1972) “Urticaria and asthma induced by food-and-drug additives in patients with aspirin hypersensitivity”, **Journal of Allergy and clinical Immunology**, 50(2), 92-98.

- Kalendar, R. and Schulman, A.H. (2005) "A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome Dynamics", ***Cytogenetic and Genome Research***, 110(1-4), 598-605.
- Kalendar, R. ve Schulman, A. H. (2006) "IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting", ***Nature protocols***, 1(5), 2478-2484.
- Kalendar, R., Flavell, A. J., Ellis, T. H. N., Sjakste, T., Moisy, C., Schulman, A. H. (2011) "Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers", ***Heredity***, 106(4), 520-530.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., Schulman, A.H. (1999) "IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques", ***Theoretical Applied and Genetics***, 98, 704-711.
- Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E., & Schulman, A. H. (2000) "Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence", ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, 97(12), 6603-6607.
- Kepekçi, A.H., İbişoğlu M.S., Yılmaz S., Kığ C. (2019) "Inter-retrotransposon polymorphism polymerase chain reaction as a tool for screening HERV polymorphisms in nasal mucosal swabs", ***ENT Updates***, 9(2), 159-165.
- Kesawat, M.S. and Das, B.K. (2009) "Molecular Markers: It's Application In CropImprovement", ***Journal Of Crop Science And Biotechnology***, 12(4), 169 181.
- Kirsch-Volders, M. and Fenech, M. (2019) "Micronucleus Assays with Human Lymphocytes for in Vitro Genetic Toxicology Testing", ***The Micronucleus Assay in Toxicology***, 157-168.
- Kirsch-Volders, M. and Fenech, M. (2019) "Micronucleus Assays with Human Lymphocytes for in Vitro Genetic Toxicology Testing", ***The Micronucleus Assay in Toxicology. RCS Publishing***, 157-168.
- Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Knasmueller, S., Holland, N., Bolognesi, C., Fenech, M.F. (2014) "Commentary: Critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals A HUMN project perspective", ***Mutation Research/Reviews in Mutation Research***, 759, 49-58.
- Kirsch-Volders, M., Vanhauwaert, A., Eichenlaub-Ritter, U., Decordier, I. (2003) "Indirect mechanisms of genotoxicity", ***Toxicology Letters***, 140, 63-74.
- Klaassen, C.D., Lu, H., Cui, J.Y. (2011) "Epigenetic regulation of drug processing genes", ***Toxicology Mechanisms and Methods***, 21(4), 312-324.

- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (2003) "Concepts of genetics", (*No. Ed. 7*). **Pearson Education, Inc.**
- Kocyigit, A., Keles, H., Selek, S., Guzel, S., Celik, H. and Erel, O. (2005) "Increased DNA damage and oxidative stres in patients with Cutaneous leishmaniasis", **Mutation Research**, 585, 71-78.
- Kontaş, S., Şekeroğlu, Z.A., Şekeroğlu, V. (2011) "Kardeş kromatid değişimi testi ve kullanım alanları", **TÜBAV Bilim Dergisi**, 4(4), 226-234.
- Koutsogeorgopoulou I., Maravelias C., Methenitou G., Koutselinis A. (1998) "Immonplogical aspects of the common food colorants, amaranth and tartrazin", **Veterinary and Human Toxicology**, 40(1), 1-4.
- Kumar, N., Singh, A., Sharma, D., Kishore, K. (2019) "Toxicity of Food Additives. In Food Safety and Human Health", **Academic Press**, London, 67-98.
- Latt, R.R., Sehrek, K.S., Loveday, C.P., and Dougherty, C.F. (1980) "Sister chromatid exchange", **Advanced Human Genetics**, 10, 267-331.
- Lecointe, P. and Lesca, P. (1978) "Absence of activity of amaranth (FD & C red no. 2) in the Salmonella/microsome mutagenicity test", **Food Cosmet. Toxicol**, 16(1), 89-90.
- Li, J., Liu, M., Jiang, J., Liu, B., Tong, H., Xu, Z., Yang, C., Qian, D. (2019) "Morphology-controlled electrochemical sensing properties of CuS crystals for tartrazine and sunset yellow", **Sensors and Actuators B: Chemical**, 288, 552-563.
- Linke, B.G., Casagrande, T.A., Cardoso, L.I.A. (2018) "Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate", **African Journal of Biotechnology**, 17(10), 306-310.
- Litt, M., Luty, J. A. (1989) "A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene", **American journal of human genetics**, 44(3), 397.
- Liu, W., Yang, Y. S., Zhou, Q., Xie, L., Li, P. A., Sun, T, (2007) "Impact assessment of cadmium contamination on rice (*Oryza sativa* L.) seedlings at molecular and population levels using multiple biomarkers", **Chemosphere**, 67(6), 1155-1163.
- Madlung, A. and Comai, L. (2004) "The effect of stress on genome regulation and structure", **Annals of Botany**, 94(4), 481-495.
- Magesa, F., Wu, Y., Tian, Y., Vianney, J. M., Buza, J., He, Q., Tan, Y. (2019) "Graphene and graphene like 2D graphitic carbon nitride: Electrochemical detection of food colorants and toxic substances in environment", **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, 23.

- Manninen, O., Kalendar, R., Robinson, J., and Schulman, A.,H. (2000) "Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley", *Molecular and general genetics mgg*, 264(3), 325-334.
- Mansour, A. (2007) "Epigenetic activation of genomic retrotransposons", *Journal of cell and molecular biology*, 6(2), 99-107.
- Martienssen, R.A. and Colot, V., (2001), DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi, *Science*, 293(5532), 1070-1074.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. (1975) "Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 72, 5135-39
- Mishra, D. (2020). "Food Colors and Associated Oxidative Stress in Chemical Carcinogenesis". *Handbook of Oxidative Stress in Cancer: Mechanistic Aspects*, 1-14.
- Mishra, P.K., Bhargava, A., Raghuram, G.V., Jatawa, S.K., Akhtar, N., Khan, S., Tiwari, A., Maudar, K. K. (2009) "Induction of genomic instability in cultured human colon epithelial cells following exposure to isocyanates", *Cell biology international*, 33(6), 675-683.
- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., Kakutani, T. (2001) "Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in Arabidopsis", *Nature*, 411(6834), 212-214.
- Moore, M.M., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, G., Cifone, M., Delongchamp, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Jenkinson, P., Kirby, P., Kirchner, S., Muster, W., Myhr, B., O'Donovan, M., Oliver, J., Omoril, T., Ouldelhkim, M.C., Panti, K., Preston, R., Riach, C., San, R., Stankowski, L.F., Thakur, A., Wakuri, S., Yoshimura, I. (2003) "Mouse Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup Report" Plymouth, UK, *Mutation Research*, 540(2), 127-140.
- Mortelmans, K. and Rupa, S.D. (2004) "Current issues in genetic toxicology testing for microbiologists", *Advances Applied Microbiology*, 56(3), 379-401.
- Mortelmans, K. and Zeiger, E. (2000) "The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay", *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 455(1-2), 29-60.
- Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulo, P., Kareli, D., Poliliou, S., Lambropoulou, V., Mourelatos, C., Lialiaris, T. (2010) "Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine", *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2934-2944.
- Muranli, F.D.G. and Kaymak, F. (2008) "Genotoxic effects of Triasulfuron in cultured human lymphocytes", *Fresenius Environmental Bulletin*, 17, 1007-1013.

- Neeratanaphan, L., Kamoller, C., Suwannathada, P., Suwannathada, P., Tengjaroenkul, B. (2020) "In residual uses in molds exposed to metals in a municipal storage reserve, geno was heavy and oxidative oxidative International", **Journal of Environmental Research and Public Health**, 17(6), 1980.
- Neeratanaphan, L., Runglawan, S., Arunrat C. (2014) "Assessment of Genotoxicity through ISSR Marker in Pistia stratiotes Induced by Lead", **EnvironmentAsia**, 7(2), 99-107.
- Noel, S. and Rath, S.K. (2006) "Randomly amplified polymorphic DNA as a tool for genotoxicity: an assessment", **Toxicology and Industrial Health**, 22(6), 267-275.
- OECD (2015) "Guidance document on revisions to OECD genetic toxicology test guidelines", **OECD Workgroup of National Coordinators for Test 42 Guidelines (WNT)**.
- Okada, E., Fujiishi, Y., Narumi, K., Yasutake, N., & Ohyama, W. (2013) "A four-day oral treatment regimen for simultaneous micronucleus analyses in the glandular stomach, colon, and bone marrow of rats", **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 758(1-2), 87-94.
- Olive, P.L., Banath J.P., D., R.E. (1990) "Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay", **Radiation Research**, 122(1), 86-94.
- Perry, P.E. and Wolff, S. (1974) "New giemsa method for the differential staining of sister chromatids", **Nature**, 251(5471), 156-158.
- Pradeep Reddy, M., Sarla, N., Siddiq, E. A. (2002) "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding", **Euphytica**, 128(1), 9-17.
- Preston, R.J., Au, W., Bender, M.A., Brewen, J.G., Carrano, A.V., Heddle, J.A., Wassom, J.S. (1981) "Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic experiments: a report of the US EPA's Gene-Tox Program", **Mutation Studies/Reviews in Genetic Toxicology**, 87(2), 143-188.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M. (1987) "Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells", **Mutation Research/Genetic Toxicology**, 189(2), 157-165.
- Radwan, S.A., Al-Sayed, A.R., Al-Shinnawy, M.S., Mohamed, O.N.A.R. (2010) "Haematological And Biochemical Changes Induced By Amaranth Impact On Male Albino Rats", **Egyptian Journal of Hospital Medicine**, 40(1), 335-349.
- Sahin, O., Karlik, E., Meric, S., Ari, S., Gozukirmizi, N. (2020) "Genome organization changes in GM and non-GM soybean [*Glycine max (L.) Merr.*] under salinity stress by retro-transposition events", **Genetic Resources and Crop Evolution**, 67(6), 1551-1566.

- Salawu, A. Wright, K., Al-Kathiri, A., Wyld, L., Reed, M., Sisley, K. (2018) "Sister chromatid exchange and genomic instability in soft tissue sarcomas: potential implications for response to DNA-damaging treatments", **Sarcoma**, 2018, 1-8.
- Saldamlı, İ. ve Uygun, Ü. (2007) "Gıda katkı maddeleri", **Hacettepe Üniversitesi Yayınları Gıda kimyası**, 533-576.
- Sarıkaya, R., Selvi, M., Akkaya, N., Acar, M., Erkoç, F. (2010) "Farklı Konsantrasyonlardaki Gıda Boyalarının Drosophila melanogaster (mwh x flr)'de Yaşama Yüzdesi Üzerine Etkisi", **Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi**, 5(1), 38-46.
- Sarıkaya, R., Selvi, M., Erkoç, F. (2012) "Evaluation of potential genotoxicity of five food dyes using the somatic mutation and recombination test", **Chemosphere**, 88(8), 974-979.
- Sasaki, Y. F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Tsuda, S. (2002) "The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives" **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 519(1-2), 103-119.
- Sasaki, Y.F., Sekilhaslı, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K., Tsuda, S. (2000) "The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Result and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database", **Critical Reviews in Toxicology**, 30(6), 629-799.
- Schulman, A. H., and Kalendar, R. (2005) "A movable feast: diverse retrotransposons and their contribution to barley genome dynamics", **Cytogenetic and genome research**, 110(1-4), 598-605.
- Schulman, A. H., Flavell, A. J., Paux, E., Ellis, T. H. (2012) "The application of LTR retrotransposons as molecular markers in plants", **In Mobile Genetic Elements**, 115-153.
- Schulman, A.H., Flavell A.J., Ellis N.T.H. (2004) "The Application of LTR Retrotransposons as Molecular Markers in Plants", **Mobile Genetic Elements Humana Press**, 145-173.
- Semerdoğan, S. (2012) "Gıda maddelerine katılan bazı sentetik azo gıda boyalarının Drosophila melanogaster'in Oregon R yabanıl ve mutant soylarında larval mortalite ve ömür uzunluğu üzerine etkileri", Yüksek Lisans Tezi, **Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Erzurum, 72-82.
- Sharma, V. and Nandineni, M.R. (2014) "Assessment of genetic diversity among Indian potato (*Solanum tuberosum* L.) collection using microsatellite and retrotransposon based marker systems", **Molecular phylogenetics and evolution**, 73, 10-17.

- Shimada, C., Kano, K., Sasaki, Y.F., Sato, I., Tsuda, S. (2010) "Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice", *The journal of toxicological sciences*, 35(4), 547-554.
- Soltani, F., Mosaffa, F., Iranshahi, M., Karimi, G., Malekaneh, M., Haghighi, F., Behravan, J. (2009) "Evaluation of antigenotoxicity effects of umbelliprenin on human peripheral lymphocytes exposed to oxidative stress", *Cell biology and toxicology*, 25(3), 291-296.
- Sorrentino, M. C., Capozzi, F., Giordano, S., Spagnuolo, V. (2017) "Genotoxic effect of Pb and Cd on in vitro cultures of *Sphagnum palustre*: An evaluation by ISSR markers", *Chemosphere*, 181, 208-215.
- Soylak, M., Baran, S., Uzcan, F. (2022) "Ultrasound assisted deep eutectic solvent based liquid phase microextraction for the preconcentration and spectrophotometric determination of amaranth (E123) in water and food samples", *Instrumentation Science & Technology*, 50(2), 203-218.
- Sudprasert, W., Navasumrit, P., & Ruchirawat, M. (2006) "Effects of low-dose gamma radiation on DNA damage, chromosomal aberration and expression of repair genes in human blood cells", *International journal of hygiene and environmental health*, 209(6), 503-511.
- Susever, S. "Gıda Katkı Maddeleri", http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/3gida_katkimaddeleri92.pdf , Son Erişim Tarihi: 09.08.2022
- Swaroop, V.R., Roy, D. D., Vijayakumar, T. (2011) "Genotoxicity of synthetic food colorants", *Journal of Food Science and Engineering*, 1(2), 128.
- Şekeroğlu Z. ve Şekeroğlu, V. (2011) "Genetik Toksisite Testleri", *Tübvav Bilim Dergisi*, 4(3), 221-229.
- Şenel, D. Ş. (2019) "Farklı Konsantrasyonlardaki ağır Metal (Cd, Ni, Pb Ve Zn) karışımlarının *Hygrophila difformis* Blume Bitkisindeki Fizyolojik Ve Genotoksik Etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Marmara Üniversitesi*, İstanbul, 61-62.
- Taylor, J.H. (1958), "Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes" *Genetics*, 43(3), 515-529.
- Thomas, O.E. and Adegoke, O. A. (2015) "Toxicity of food colours and additives: A review", *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 9(36), 900-914.
- Tucker, J.D. and Preston, R.J. (1996) "Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment", *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 365(1-3), 147-159.
- Turhan, S. (2016) "Kuraklık stresinin buğdayda (*Triticum aestivum* L.) meydana getirmiş olduğu retrotranspozon polimorfizmi üzerine selenyumun etkisinin

belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı*, Erzurum, 48-54

- Wahabi, M. S. and Bukhari, N. A. (2014) “Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis to molecular characteristic determination of *Heliotropium digynum* in Saudi Arabia”, *International Journal*, 2(10), 902-906.
- Waterston, R.H. and Pachter, L. (2002) “The first sequencing and comparative analysis of the mouse genome” *Nature*, 420(6915), 520-562.
- Weisburger, J. H. (1999) “Antimutagens, anticarcinogens, and effective worldwide cancer prevention”, *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 18(2), 85-93.
- Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J., Capy, P., Chalhoub, B., Flavell, A., Leroy, P., et al (2007) “A Unified Classification System for Eukaryotic Transposable Elements”, *Nature Genetics*, 8, 973-982.
- Wilson III, D.M. and Thompson, L.H. (2007) “Molecular mechanisms of sisterchromatid exchange”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 616(1-2), 11-23.
- Wilson, G.G. (1988) “Type II restriction-modification systems”, *Trends in Genetics*, 4 (11), 314-318.
- Yamjala, K., Nainar, M. S., Ramiseti, N. R. (2016), “Methods for the analysis of azo dyes employed in food industry—a review”, *Food chemistry*, 192, 813-824.
- Yannic, G., Baumel, A., Ainouche, M. (2004) “Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina maritima* (*Poaceae*), a salt-marsh species in decline along the Western European Coast”, *Heredity*, 93(2), 182-188.
- Yemiş, A.B. (2020) “Bitki model organizması *vicia faba* üzerine gıda boyası amarantın mitotik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Gebze, 24-38
- Yetgin, Ö. (2019) “Bor stresi altında yetiştirilen çeltik ve Türk Kır Çeltiği bitkilerinde retrotranspozon analizleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı*, Samsun, 80-84.
- Yiğider, E. (2016) “Ağır metal stresinin mısırdaki (*Zea mays* L.) meydana getirmiş olduğu retrotranspozon polimorfizmi üzerine humik asitin etkisinin belirlenmesi”, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı*, Erzurum, 86-96.
- Yilmaz, S., Marakli, S., Yuzbasioglu, G., Gozukirmizi, N. (2018) “Short-term mutagenicity test by using IRAP molecular marker in rice grown under herbicide treatment”, *Biotechnol Biotechnol Equip*, 32(4), 923-8.

- Yorgancılar M., Yakışır E. ve Erkoyuncu M.T. (2015) “Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı”, *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12.
- Young, R.R. (2002) “Genetic toxicology : web resources”, *Toxicology*, 173(1-2), 103-21.
- Yurttagün M., (2010) “Gıda Katkı maddeleriyle ilgili geniş kapsamlı bir araştırma”, <http://www.saglikvakfi.org.tr/html/gkm.asp>
- Yüzbaşoğlu, G., Yılmaz, S., and Gozukırmızı, N., (2016), “Houba retrotransposon-based molecular markers: a tool for variation analysis in rice”, *Turkish journal of agriculture and forestry*, 40, 456–464.
- Yüzbaşoğlu, D., Mamur, S., Avuloglu-Yılmaz, E., Erikel, E., Celebi-Keskin, A., Unal, F. (2021) “Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects of exopolysaccharide pullulan in human lymphocytes in vitro”. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 870, 503391.
- Yüzbaşoğlu, D., Yılmaz, E.A. ve Ünal, F. (2016) “Antidepresan ilaçlar ve genotoksisite”, *TÜBAV*, 9(1), 17-28.
- Yüzbaşoğlu, D., Zengin, N., Ünal, F.,(2014) “Gıda koruyucuları ve Genotoksisite testleri”, *Dergipark*, 39(3), 179-186
- Zeiger, E. (1998), “Identification of rodent carcinogens and noncarcinogens using genetic toxicity tests: Premises, promises, and performance. Regulatory” *Toxicology and Pharmacology*, 28; 85-95.
- Zeiger, E. (2010). “Historical perspective on the development of the genetic toxicity test battery in the United States”. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(8-9), 781-791.
- Zeiger, E., (2004) “History and rationale of genetic toxicology testing: an impersonal, and sometimes personal view”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 44, 363-371.
- Zhang, G., and Ma, Y. (2013) “Mechanistic and conformational studies on the interaction of food dye amaranth with human serum albumin by multispectroscopic methods”, *Food chemistry*, 136(2), 442-449.
- Zhang, Z., Che,W., Liang, Y., Wu, M., Li, N., Shu, Y., Liu, F., Wu, D. (2007), “Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts”, *Toxicology in Vitro*, 21 ,1058-1065.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994) “Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification”, *Genomics*, 20(2), 176-183.



EKLER

Ek-1. Tez Çalışması Süresince Yapılan Akademik Çalışmalar

Kırtılı, S., Yıldırım Doğan, N. (2022) “İnsan lenfositlerinde gıda boyası amaranthın meydana getirdiği genetik değişikliklerin IRAP yöntemi ile incelenmesi”, **6. Uluslararası Akademik Öğrenci Çalışmaları Kongresi**, İstanbul, 459.

