T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GIDA KATKI MADDESİ FERROLAKTAT (E585) 'IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*' DE YAPTIĞI GENOTOKSİK ETKİLERİN SMART TESTİ VE COMET ASSAY YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Süleyman DAYANIKLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER

EDİRNE - 2014

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Yılmaz ÇAMLITEPE
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoloji Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Ünvan, Ad, Soyad):	İmza
Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER	
Prof. Dr. Yasemin BAKIRCIOĞLU KURTULUŞ	
Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA	

Tarih: 16/06/2014

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

16/06/2014

Süleyman DAYANIKLI

Yüksek Lisans Tezi

Gıda Katkı Maddesi Ferrolaktat (E585) 'ın *Drosophıla melanogaster*' de Yaptığı Genotoksik Etkilerin SMART Testi ve Comet Assay Yöntemiyle Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada, 72±4 saatlik *D.melonagaster* transheterezigot (mwh/flr^3) larvaların ferrolaktat' lı besiyerlere maruz bırakılarak, İn vivo bir test sitemi olan somatik mutasyon ve rekombinasyon test sistemi (SMART) ile metamorfoz geçiren ergin bireylerin kanat imajinal disk hücrelerinde nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve rekombinasyon sonucu meydana gelen genetik değişikliklerin Graf vd. (1984) sınıflandırma tekniğine dayanılarak kanatlardaki mutant trikomların tespit edilmesi ve istatistiksel olarak mutajenik ve rekombinojenik etkisi olup olmadığı araştırılmış olup, sonuçta 0.005' lik ferrolaktat derişimi uygulamasının kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda fark oluşmadığı, 0.015 ve 0.025' lik ferrolaktat derişimlerinin ise istatistiksel olarak anlamlı/pozitif fark oluşturduğu gözlenmiştir.

Oregon R+ soyuna ait yabanıl tip *Drosophila melanogaster*' in 72±4 saatlik larvalarının 24 saat süreyle ferrolaktat' lı besiyerlere maruz bırakılması ve 96±4 saatlik larvalardaki hemositlerin Irving vd. (2005) geliştirdiği teknik yardımıyla izole edilmesi, Singh vd. (1988) DNA hasarının tespit edilmesinde kullandıkları Comet Assay testi ile DNA hasarının belirlenmesi amacıyla, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu ortalamaları parametrelerinin kullanılarak kontrol grubu ile karşılaştırılması yapılmış, çalışma sonucunda; 0.005 ve 0.015' lik ferrolaktat derişimlerinin kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamda fark oluşmadığı, 0.025' lik ferrolaktat derişiminin ise istatistiksel olarak pozitif fark oluşturduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada, *Drosophila melanogaster*' de Kanat benek testi yöntemi (SMART) uygulaması ve *Drosophila melanogaster* hemositlerinde Comet Assay yöntemi ile yapılan uygulama sonuçlarında ferrolaktat' ın artan derişimlerinin DNA hasarına neden olduğu ve genotoksik risk oluşturabileceği tespit edilmiştir.

Yıl : 2014
Sayfa Sayısı : 123
Anahtar Kelimeler : *Drosophila melanogaster*, Ferrolaktat, Comet Assay, Somatik Rekombinasyon ve Mutasyon Testi (SMART), Genotoksisite.

Master Thesis

Investıgatıon Of Genotoxic Effects of Food Additive Ferrous lactate on the SMART and Comet Assay of *Drosophila melanogaster*

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Biology

ABSTRACT

In this study, three different concentrations 0.005, 0.015 and 0.025 of the food additive ferrous lactate (E585) were experimentally applied to *Drosophila melanogaster* larvae which were reared in the laborataory. The wing spot test, namely SMART (Somatic Recombination and Mutataion Test) and in Vivo Comet Assay tests were applied to analyse whether this food colouring agent has genotoxic effects in the larvae haemocytes of *D. melanogaster*.

Three different concenntrations of ferroous lactate were added to the mediums where the flies were fed chronically during the course of the study. Also, negative control mediums prepared with distilled water and positive control mediums prepared with 4mM EMS (Ethyl Methyl Sülfonate) were used for the comparisons. The Kolmogorov-Smirnov test used to check the normality whether the data is appropriate for the parametric tests. The t-test was applied to see differences between the data groups wherever possible to test the statistical significance beyond the 0.05 level.

According to SMART test results, the 0.005 concentrations of ferrous lactate did not show significant effect for inducing the mutant wing spots compared to control groups. However, the 0.015 and 0.025 concentrations of this food colouring agent induced significantly the number of mutant spots.

The Comet Assay results also gave similar results. That is, the 0.005 concentration of ferrous lactate did not show significant effect for inducing the DNA damage in the larvae hemocytes compared to control groups. However, the other two concentrations of ferrous lactate signicicantly induced the damage associated with intensive, longer DNA tails and moments.

Although as the concentraions of the food additive ferrous lactate increase in the medium it results more genotoxic effects, the significant genotoxic effects appear after about the 0.015 concentration in the larvae haemocytes of *D. melanogaster*.

Yıl : 2014

Sayfa Sayısı : 123

Anahtar Kelimeler : *Drosophila melanogaster*, Ferrouslactate, Comet Assay, Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), Genotoxicity.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel anlamda kendimi geliştirmeme katkıda bulunan, vaktini, emeğini ve değerli fikirlerini esirgemeyen, her zaman desteğini hissettiğim, tez çalışmamın planlanmasında ve hazırlanmasında emeği geçen, azmini ve çalışkanlığını bir ömür boyu örnek alacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Selçuk YURTSEVER' e;

Yüksek lisans eğitimim boyunca laboratuvar çalışmalarımda bana destek olan Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü lisans öğrencileri Hazal SEZGİNER, Uğur AKGÜN, Gizem GÜR, yüksek lisans öğrencisi Merve ERMİŞ' e, doktora öğrencisi Aylin Yılmaz ÇETİNKAYA' ya, ayrıca Üniversite arkadaşlarım Abdulkadir ve Melek DELİOĞLU' na, Yavuz DİLEKÇİ' ye, Selçuk AYDOĞAN' a, Kamuran ORUÇLU' ya;

Birikimlerini paylaşan, yardımlarını esirgemeyen, desteklerini gördüğüm, "Bilgi paylaştıkça çoğalır" felsefesini yaşam tarzı edinmiş olmalarıyla hayatımda iz bırakan sayın Prof. Dr. Bülent KAYA' ya, Doç. Dr. Eşref DEMİR' e, Araştırma Görevlileri Fatma TURNA ve SEZGİN AKSAKAL' a;

Yüksek lisans eğitimi aldığım süre içerisinde görev yapmakta olduğum kurumumda bana destek olan sayın M. Masum ÖZÇİÇEK'e, Sedat YILMAZ' a, Yalçın ÖZARSLAN' a, M. Salih BARUT' a, Temel KESKİN' e, Sercan ALKAN' a, Sedat KARATAY' a, Yusuf SARMAN' a, Şükrü ŞAHİNLİ' ye, Kıymet DEĞİRMENCİ' ye, Selim POYRAZ' a, Ahmet AYKAR' a, Faruk KOŞAK' a ve eski meslektaşım Arş. Gör. Ali ÖZDEMİR' e, ayrıca desteklerinden dolayı Sedat KAYA' ya, Dr. Mustafa Kemal ÖZKAN ve Şefika ÖZKAN' a, Veysel BORAN' a, İsmail GÜRBÜZ'e;

Tabi ki eğitim hayatımın temelini atan İkinci İnönü İlköğretim Okulu sınıf öğretmenim sevgili Serpil ÇETİN' e ve Ortaokul dönemimde iyi bir eğitim almama fazlasıyla destek veren Eski Adana Defterdarı sayın Süleyman TOYAN' a;

Vazgeçilmezlerim, aldığım eğitim sırasında ve hayatımın her anında yanımda olan güvenlerini ve sonsuz sevgilerini hep üzerimde hissettiğim, varlıklarıyla daha güçlü olmamı sağlayan; annem Suna DAYANIKLI' ya, dayılarım Halil KILIÇ ve Esef KILIÇ'a, ablam Sıdıka TAN' a, Enişte m Musa OĞUZ' a, anneannem Seher KILIÇ' a ve geniş ailemin diğer bireyleri ile,

Trakya Üniversitesindeki hocalarıma en içten dileklerimle teşekkür ederim…

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT. iii
İÇİNDEKİLER v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ x
TABLOLAR LİSTESİ xiii
1. GİRİŞ 1
1.1. Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Genel Bilgiler 3
1.2. Çalışmada Kullanılan Ferrolaktat'ın Genel Özellikleri 7
1.3. Çalışmada Kullanılan *Drosophila melanogaster* ile İlgili Genel Bilgiler. . 9
1.3.1. *Drosophila melanogaster*'in Sistematikteki Yeri 10
1.3.2. *Drosophila melanogaster*' in Yaşam Döngüsü 10
1.3.2.1. Yumurta Evresi 12
1.3.2.2. Larva Evresi 12
1.3.2.3. Pupa Evresi 12
1.3.2.4. Ergin Evresi 13
1.4. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) 16
1.4.1. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi Uygulama Basamakları 17
1.4.2. Kullanılan Hatların Genel Yapısı 17
1.5. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi 24
1.5.1.Tek Hücre Jel Elektroforez veya Comet Assay Yöntemi Uygulama Basamakları 26
1.5.2. Yöntemin Avantajları ve Dezavantajları 33
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI. 35
3. MATERYAL VE METOD 40
3.1. Standart Besiyer Hazırlanması 41

3.2. Kanat SMART Testi Uygulamasında Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar. 43

3.3. Comet Assay Testi Uygulamasında Kullanılan Kimyasallar 44

3.3.1. Comet Assay veya Tek Hücre Jel Elektroforezi Testinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması 45

3.4. *Drosophila melanogaster*' de SMART Testinin Uygulanması Aşaması . 51

3.4.1. Deney Düzeneği ve Uygulama Aşamaları 51

3.4.2. Kanat SMART Testi Uygulama Basamakları 53

3.4.2.1. Çaprazlama Yapılması İçin Birey Toplanması Aşaması . . . 53

3.4.2.2. Yumurta Toplanması ve 72±4 Saatlik Transheterezigot Larvaların Elde Edilmesi Aşaması 55

3.4.2.3. 72±4 saatlik Transheterezigot Larvaların Toplanarak Ferrolaktat Uygulaması ve Gelişen Erginlerin Toplanması Aşaması. 57

3.4.2.4. Kanat Preparatlarının Hazırlanması Aşaması 59

3.4.2.5. Kanat Preparatlarının Mikroskopta Analiz Edilmesi Aşaması. 62

3.4.2.6. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması Aşaması 63

3.4.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi Aşaması. 64

3.5. *D. melanogaster* Hemositlerinde Comet Assay Yöntemi Olarakta Bilinen Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminin Uygulanması Aşaması. . 65

3.5.1. Deney Düzeneği ve Uygulama 65

3.5.1.1. 8 Saat Yumurta Toplaması ve Yumurtaların 72±4 Saatlik Larva Haline Gelmesi Aşaması 68

3.5.1.2. 3. İnstar Evresindeki 72±4 Saatlik Larvaların Toplanması ve 24 Saat Kimyasal uygulanması Aşaması . . . 70

3.5.1.3. 96±4 Saatlik Larvaların Toplanması ve Sterilizasyon Aşaması 72

3.5.1.4. *Drosophila* Hemositlerinin İzole Edilmesi Aşaması 74

3.5.1.5. Slaytların Hazırlanması Aşaması 76

3.5.1.6. Lizis Uygulaması Aşaması 78

3.5.1.7. DNA Çift Sarmal Yapısının Çözülmesi Aşaması 80

3.5.1.8. Elektroforez İşlemi Uygulama Aşaması 82

3.5.1.9. Nötralizasyon İşlemi Uygulama Aşaması 83

3.5.1.10. Boyama İşlemi Uygulama Aşaması 85

3.5.1.11. Değerlendirme Aşaması 87

4. BULGULAR 88

4.1. 72 ± 4 Saatlik Transheterezigot Larvalara Ferrolaktat' ın Derişimleri, Distile Su ve Etil Metan Sülfonat' ın (EMS) Uygulanmasına İlişkin Kanat Testi (SMART) Sonuçları 88

4.2. 72 ± 4 Saatlik Oregon R+ Genetik Soyundan Larvalara Ferrolaktat' ın Derişimleri, Distile Su ve Etil Metan Sülfonat' ın (EMS) 24 Saatlik Uygulamalarına ait Comet Assay Yöntemi Sonuçları 95

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 103

6. KAYNAKLAR 111

ÖZGEÇMİŞ 123

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
♀	Erkek
♂	Dişi
Bd^S	Beaded Serrate
cm	Santimetre
^0C	Santigrat Derece
E 585	Ferrolaktat
flr^3	Flare Geni
Ha	Alternatif Hipotez
Ho	Orijinal Hipotez
(i)	Önemsiz Fark
Mwh	Multiple Wing Hair Geni
g	Gram
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
µ	Mikro
µl	Mikrolitre
kg	Kilogram
Oregon R+	*Drosaphila melanogaster* Yabanıl Tip

Kısaltmalar

ADI	Günlük Kabul Edilebilir Alım Düzeyi
CAC	Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu
CCFAC	Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi
EMS	Etil Metan Sülfonat
FAO	Gıda Tarım Örgütü
JECFA	Gıda Katkı Maddeleri Eksper Komitesi
SCGE	Tek Hücre Jel Elektroforez Testi
SMART	Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi
DNA	Deoksiribonükleik asit
UV	Ultraviyole
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. *Drosophila melanogaster*' in yaşam döngüsünün gösterilmesi . . 11

Şekil 1.2. *Drosophila melanogaster* ergin bireyinin pupadan çıkmadan önceki görünüşü 13

Şekil 1.3. Dişi ve erkek *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin ayırt edici özellikleri 15

Şekil 1.4. Mutasyona uğramış *Drosophila melanogaster,* kanatları körelmiş ve abdomenin yarısına kadar uzanmış halde 16

Şekil 1.5. *Drosophila* kanat SMART testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki konumları 17

Şekil 1.6. flr^3 / *TM3,* Bd^S bireylerindeki homozigot letal etkiler 18

Şekil 1.7. Dengeleyici kromozom taşımayan normal kanat ve dengeleyici kromozom taşıyan serrat kanat fenotipleri 19

Şekil 1.8. *Drosophila melanogaster*'de kanat somatik mutasyon ve Rekombinasyon testinin şematik olarak gösterilmesi 20

Şekil 1.9. *Drosophila melanogaster* kanat trikomlarının görünümü 21

Şekil 1.10. *Drosophila melanogaster*' e ait farklı klon türleri 22

Şekil 1.11. *mwh/*flr^3 genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anomali şekilleri 23

Şekil 1.12. Alkali ve nötral yöntemler için genel deney protokolü 25

Şekil 1.13. *Drosophila* Hemositlerinde Comet Assay yönteminin genel uygulama şeması 28

Şekil 1.14. Görüntü analiz sisteminde verilerin hesaplanması 32

Şekil 1.15. Hücrelerin hasar durumlarına göre sınıflandırılmaları 33

Şekil 3.1. Asit karışımı eklenmemiş standart besiyerde fungus oluşumu . . . 42

Şekil 3.2. Steril olmayan kültür ortamında bulunan mayt (akar) görünümü 42

Şekil 3.3. Elektroforez solüsyonu hazırlanmasının gösterilmesi 45

Şekil 3.4. Nötralizasyon solüsyonu hazırlanmasının gösterilmesi 46

Şekil 3.5. Lysis solüsyonu hazırlanmasının gösterilmesi 47

Şekil 3.6. LMA- Low Melting Agarozun hazırlanmasının gösterilmesi . . . 48

Şekil 3.7. NMA- Normal Melting Agaroz solüsyonu ve NMA kaplı lamların hazırlanmasının gösterilmesi 49

Şekil 3.8. Etidyum Bromürlü karışımın hazırlanmasının gösterilmesi 50

Şekil 3.9. *Drosophila melanogaster*' de kanat SMART testi uygulamasına ait deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi 52

Şekil 3.10. Kanat SMART testi uygulamasında Çaprazlama yapılması için birey toplanması aşamasının şematik olarak gösterilmesi 54

Şekil 3.11. Kanat SMART testi uygulamasında 72±4 saatlik transheterezigot Larva elde edilmesi aşamasının şematik olarak gösterilmesi 56

Şekil 3.12. Kanat SMART testi uygulamasında 72±4 saatlik transheterezigot larvaların toplanarak kimyasal uygulanması aşamasının gösterilmesi 58

Şekil 3.13. Kanat SMART testinde kanat preparatlarının hazırlanmasının gösterilmesi (1) 60

Şekil 3.14. Kanat Preparatlarının hazırlanmasının gösterilmesi (2) 61

Şekil 3.15. Kanat sektörlerinin isimlendirilmesi 62

Şekil 3.16. Kanat preparatlarının mikroskopta incelenmesinin gösterilmesi. . 63

Şekil 3.17 *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulaması deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi 66

Şekil 3.18. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında tek bir derişime ait deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi 67

Şekil 3.19. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında yumurta toplaması ve 72±4 saatlik larvaların elde edilmesinin şematik olarak gösterilmesi 69

Şekil 3.20. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında 72±4 saatlik larvaların toplanması ve 24 saat kimyasal uygulanması aşamasının gösterilmesi 71

Şekil 3.21. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında 96±4 saatlik larvaların toplanarak steril edilmesi aşamasının gösterilmesi . . . 73

Şekil 3.22 *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında 96±4 saatlik *larva* hemositlerin izole edilmesinin gösterilmesi 75

Şekil 3.23. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında slaytların hazırlanmasının gösterilmesi 77

Şekil 3.24. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında Lizis uygulamasının gösterilmesi 79

Şekil 3.25. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında DNA çift sarmal yapısının çözümlenmesi aşamasının gösterilmesi 81

Şekil 3.26. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında Elektroforez aşamasının gösterilmesi 82
Şekil 3.27. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında Nötralizasyon uygulama basamağının gösterilmesi 84
Şekil 3.28. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında hedef hücrelerin EtBr ile boyanması aşamasının gösterilmesi 86
Şekil 3.29. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında hücrelerin İşaretlenerek Mikroskop altında değerlendirme ve ölçüm yapılması aşamasının gösterilmesi 87
Şekil 4.1. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin kanatlarında meydana getirdiği sınıflandırılmış klonların büyüklüklerinin ve frekanslarının karşılaştırılması 92
Şekil 4.2. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin kanatlarında meydana getirdiği sınıflandırılmış klonların karşılaştırılması. 93
Şekil 4.3 Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin kanatlarında meydana getirdiği toplam klon sayıları ve toplam frekans sayılarının karşılaştırılması 94
Şekil 4.4 Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde comet assay yöntemi ile kuyruk yoğunluğu verilerinin karşılaştırılması. 99
Şekil 4.5. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde comet assay yöntemi ile kuyruk momenti verilerinin karşılaştırılması. 100
Şekil 4.6. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde comet assay yöntemi ile kuyruk uzunluğu verilerinin karşılaştırılması 101
Şekil 4.7. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde comet assay yöntemi ile kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu verilerinin karşılaştırılması 102

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. *Drosophila* standart besiyerinin içeriği 41

Tablo 3.2. *Drosophila* standart besiyerinde kullanılan asit karışımının içeriği 41

Tablo 3.3. Faure çözeltisinin içeriği 43

Tablo 3.4. *Drosophila melanogaster* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testinde Kullanılan Kimyasallar 43

Tablo 3.5. Comet Assay veya Tek Hücre Jel Elektroforezi Testinde Kullanılan Kimyasallar ve hangi aşamalarda kullanıldıkları. 44

Tablo 3.6. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi 64

Tablo 4.1. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) sonuçlarına ait istatistiksel bilgiler 91

Tablo 4.2. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Comet Assay yöntemi ile kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ortalamalarına ait istatistiki veriler 98

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Genetik toksikoloji, hücre ve organizmada kalıtım mekanizması ile genetik materyalde çeşitli kimyasalların ve radyasyonun etkilerini ortaya çıkaran bir sitemdir [1]. Günümüzde yapılan genetik çalışmaların önemli bir kısmını genetik toksikoloji alanı oluşturur. Yapılan genetik çalışmalarda mutasyonların belirlenmesine yönelik olarak geliştirilen genotoksisite testlerine Allium testi, mikronükleus testi, kardeş kromatid değişim testi, *Drosophila* testleri, tek hücre jel elektroforezi gibi in vivo ve in vitro test sistemleri örnek verilebilir.

Çeşitli kimyasal veya fiziksel etkenlerin genotoksik etkilerle DNA moleküllerinde yaptıkları değişikliklere mutasyon, mutasyona neden olan maddeye mutajen, mutasyon sonucu oluşan organizmaya da mutant adı verilmektedir [2]. Mutasyonlar; kimyasallara, radyasyona, virüslere maruz kalma veya mitoz ile mayoz gibi süreçler sırasında hücresel kontrol altında da meydana gelebilirler [3]. Mutasyon bir anlamda da genetik bilginin hatasız depolanmasındaki başarısızlık olarak ta adlandırılır [4].

Çok hücreli organizmalarda mutasyonlar germ hücreleri (üreme hücreleri) mutasyonları ve somatik hücre mutasyonları olarak ikiye ayrılır. Germ hücresi mutasyonları gelecek nesillere aktarılabilen ve kalıtsal hastalıkların oluşmasına sebep olan mutasyon şeklidir. Mutasyonların somatik hücrelerde meydana gelmesi durumunda somatik mutasyon olarak isimlendirilirler. Somatik mutasyonlar hücrelerin ölümünden, hasarlanmalarından, hücrelerin malign hale dönüşerek kanser oluşumundan ve yaşlanmadan sorumludurlar. DNA'da oluşan hasarlar gen düzeyinde (gen mutasyonları veya nokta mutasyonları) veya kromozom düzeyinde (sayısal ve yapısal aberasyonlar) mutasyonlar olarak adlandırılmaktadırlar [5,6,7,8].

Nokta mutasyonlar, sıklıkla kimyasalların etkileri ve DNA replikasyonundaki hatalar ile oluşurken, aynı zamanda tek veya birkaç nükleotidi etkileyen mutasyonlar olup bir nükleotidin diğerine değişmesi veya nükleotid eklenmesi yada nükleotid kaybı ile

meydana gelirken; kromozomal mutasyonlar, hem içsel hem dışsal faktörlerden dolayı meydana gelebilir [7,9].

Mutasyonlar bazı durumlarda organizmanın kendisinden kaynaklanan sebeplerle de oluşabilir. Bu şekilde kendiliğinden oluşan mutasyonlara spontan mutasyon adı verilir [10,11]. İnsanlarda her saniyede 10^7 hücre bölünmektedir. Bu hücrelerin yaklaşık üçte birinde spontan mutasyon olduğu değerlendirilmektedir. Bu mutasyonlar; DNA replikasyonu veya DNA onarımı sırasında oluşabildiği gibi hidroliz, oksidasyon ve elektrofilik atakları içeren kimyasal olaylarda da oluşabilir. Bu reaksiyonlar hücrelerin eksojen kaynakların (çevresel ajanlar, besin içerikleri vb.) etkisiyle veya endojen kaynakların etkisiyle başlayabilir. Eksojen kaynaklı kimyasalların insanda meydana gelen DNA hasarının en önemli kaynağı olduğu bilinmektedir [12].

Besinlere bir takım kimyasal maddelerin eklenmesi tekniği, aslında çok eski yıllara insanın eti tuzla korumasına (prezervasyon) kadar uzanır. Eski çağlarda yaşayan insanların gıdalarını koruyabilmek için gıdalarını tuzladıkları, tütsüledikleri, sirke kullandıkları ve salamura yaptıkları ve besinlerinin görünüşünü de güzelleştirmek için böcek kabuklarını ezerek elde ettikleri kırmızı boya ve safran gibi doğal boyaları kullandıkları, yine besinlerinin kıvamlarını arttırmak amacıyla arap sakızı (gam arabik) kullandıkları bilinmektedir [13,14].

İnsanoğlu besin maddelerinin tüketim sürelerini uzatmak, bir yerden diğer yere gönderme sırasında bozulmalarını önlemek amacıyla çeşitli teknikler geliştirilmiştir. Bunlar;

1. Isı uygulaması (pişirme, pastorizasyon, kurutma vb.)
2. Soğuk (dondurma işlemi vb.)
3. Kurutma
4. Fermentasyon
5. Fiziksel işlemler (vakum, yoğunlaştırma, ışınlama vb.)
6. Kimyasal maddelerle işlem (şeker, tuz-baharat, asitler ve diğer katkı maddeleri, pestisitlerin uygulanması) teknikleridir.

Kimyasal maddelerle yapılan işlemlerin asıl amacı, besin üzerindeki hoşa gitmeyen gereksiz değişiklikleri (tat, koku, görünüm vb.) geciktirmek, zorlaştırmak veya maskelemektir [13].

1.1. Gıda Katkı Maddeleri İle İlgili Genel Bilgiler

Gıda katkı maddeleri, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde şöyle tanımlanmaktadır. "Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıda ham yada yardımcı maddesi olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, seçilen teknoloji gereği kullanılan, işlem veya imalat sırasında kalıntı veya türevleri mamul maddede bulunabilen, gıdanın üretilmesi, tasnifi, işlenmesi, hazırlanması, ambalajlanması, taşınması, depolanması sırasında gıda maddesinin tat, koku, görünüş, yapı ve diğer niteliklerini korumak, düzeltmek veya istenmeyen değişikliklere engel olmak ve düzeltmek amacıyla kullanılan maddelerdir" denilmektedir [15].

Gıda katkı maddelerinin sahip olmaları gereken özellikler ve gıdalarda kullanılması gereken miktarlar uluslararası platformlarda üzerinde çalışılan bir konudur. Bu amaçla Gıda Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nün oluşturduğu Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC)' nun bünyesinde kurulan Gıda Katkıları ve Kontaminantları Kodeks Komitesi (CCFAC) katkı maddeleri ile ilgili tüm konularda görüş ve önerilerde bulunan bir kuruluştur [16].

1.1.1. Gıda katkı maddelerinin kullanım amaçları;

1. Gıdanın bileşimindeki besin öğelerinin kaybını önlemek,
2. Gıdanın kalitesini ve sağlamlığını sürdürmek ve ziyan olmasını önlemek,
3. Gıdanın görünüşünü güzelleştirmek ve şeklini düzeltmek,
4. Gıdaların lezzet, tat ve kokusunun daha hoşa gidecek duruma gelmesini sağlamak ve besin değerini yükseltmek,
5. Gıdanın besleyici değerini korumak,
6. Gıda hazırlamada yardımcı olarak kullanmak [16,17].

Gıda katkı maddeleri, gıda sanayisinde yukarıda belirtilen amaçlar doğrultusunda kullanıldıklarında, katkı maddelerinin pek çok yararı bulunmaktadır. Ancak, gıda katkı maddelerinin, yasal olmayan kullanım biçimleri de mevcuttur. Bunlara kalitesiz veya bozulmuş gıdayı maskeleme, gıdaları hatalı işleme, taklit gıda yapımı ve tüketiciyi aldatma, ürünün besleyici değerini azaltma, istenilen etkiyi oluşturacak miktardan fazla kullanma örnekleri verilebilir [16].

Gıda katkı maddeleri ve koruyucu katkı maddeleri modern dünyanın vazgeçilmezleri arasındadır. 19. yüzyılda hızlı kentleşme ve gelişen teknoloji ile birlikte hazır gıdaları boyanması, besleyici olması, tatlandırma veya gıda bozulmalarının önüne geçilebilmesi amacıyla gıda katkı maddelerinin kullanımı yaygınlaştırmıştır. Gıda katkı maddelerinin 1900' lü yıllardaki pazar payı 10 milyar dolar iken 21. yüzyılda bu Pazar her geçen gün büyümektedir. Günümüzde 20.000' in üzerinde katkı maddesinin olduğu ve bu maddelere bağlı çeşitli alerjik reaksiyonlara rastlandığı bilinmektedir [18,19,20].

Batı ülkelerinde alınan gıdaların %75' ini işlenmiş ürünler oluşturmakta ve bu ürünlerde de çok çeşitli gıda katkı maddeleri kullanılmaktadır. Yapılan hesaplamalar da batı toplumunun yılda 5-6 kg veya daha da fazla katkı maddesi tükettiğini göstermektedir. Bu maddelerin kullanımıyla ilgili birçok aksi tesir belgelenmiştir. Bunlar arasında egzama, ürtiker, dermatit, barsak sendromu, bulantı, kusma, ishal gibi gastrik rahatsızlıklar, migren, anaflaksi, hiperaktivite ve diğer davranış bozuklukları sayılabilir [21].

Gıda katkı maddelerini tanımlanması ve herhangi bir karışıklığa yol açılmaması amacıyla, gıda katkı maddelerine Avrupa Birliği' nin (European Community) simgesi olarak "E" harfi ve üç rakamlı sayı ile oluşturulan kodlar verilmiştir [22]. "E" numara sistemi ile gıda katkı maddelerinin temel işlevlerine göre sınıflaması şu şekildedir.

1- Renklendiriciler: E100- E 180,
2- Koruyucular: E200- E 297,
3- Antioksidanlar: E300- E 321,
4- Emülsifiyer ve Stabilizatörler: E322- E 500,
5- Asit-baz sağlayıcılar: E500- E 578,
6- Tatlandırıcılar, koku verenler: E620- E 637,
7- Geniş amaçlı gıda katkı maddeleri: E900- E 927 [23].

Gıda katkı maddelerinin kanser, doğum kusurları, sinir sistemi yada diğer organlar üzerinde olumsuz etkilerini belirlemek ve yasalara uygun olarak kullanılabilmesi için akut, kronik ve farmakolojik deneylerin, fare dışında iki değişik hayvanın üzerinde yapılmış olması zorunludur [24]. Her bir gıda katkı maddesinin, ömür boyu tüketilmesine rağmen hiçbir sağlık riski oluşturmadan günlük alınabileceği hesaplanan miktarlarının

vücut ağırlığı bazındaki değerine günlük kabul edilebilir alım düzeyi (ADI) adı verilir ve mg/kg cinsinden hesaplanır [25].

Gıda katkı maddelerinin ADI düzeyindeki değerlerinde ömür boyu tüketilmesine rağmen hiçbir sağlık riski oluşturmayacağı gibi bir ifade kullanılmış olsa dahi, kullanımına izin verilen gıda katkı maddelerinin insanlar tarafından sürekli olarak alınması halinde toksik etkiler gösterebilecekleri çeşitli araştırmalarda tespit edilmiştir [26]. Katkı maddeleri gelişigüzel miktarlarda ve tüzük dışı olarak gıdalarda kullanıldığı takdirde halk sağlığı açısından zararlı olabilir. Son zamanlarda kimyasal kanserojenlere maruz kalma, önemli bir sorun haline gelmiştir. Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek dozlarda kullanılsalar dahi bu maddelerin bir süre sonra vücutta birikerek insan sağlığını tehdit edebilecek miktarlara ulaşabileceği, dokularda hasar meydana getirebileceği, kısaca insan için mutajenik ve kanserojenik olabileceği gibi konular göz ardı edilmemelidir [14].

1.1.2. Gıda Katkı Maddelerinin Fonksiyonlarına Göre Sınıflandırması

1. Kalınlaştırıcılar: Bağlayıcılar, hacim verici ajanlar, doku ajanları,
2. Koruyucular: Antimikrobiyal koruyucular, Antimikrobik sinerjistler, Antiküfler ve antirope ajanlar,
3. Köpürtme ajanları: Havalandırıcı ajanlar, Köpürtme ajanları, Çırpma ajanları,
4. Köpürmeyi önleyici ajanlar,
5. Lezzet artırıcılar: MSG, aldehitler, esterler, alkoller vb.
6. Nem vericiler: Nem/su tutucu ajanlar, Islatma ajanları (gliserin, sorbit, propilen glikol),
7. Parlatma ajanları: Kaplama ajanları, Film/forming ajanları, Parlatma ajanları, Cilalama ajanları, Kapatma ajanları, Yüzey ajanları,
8. Renklendiriciler: Dekoratif pigmentler, Yüzey renklendiricileri (eritrosin, ponso 4R, indigotin vb.),
9. Renk koruyucular: Renk tamamlayıcılar, Renk sabitleyiciler, Renk koruyucu ajanlar,
10. Stabilizatörler: Kolloidal stabilizatör, Emülsifiyer stabilizatör, Köpük stabilizatörleri, Stabilizatörler (amonyum karbonat, kalsiyumklorür, kalsiyumsitrat),
11. Tatlandırıcılar (aspartam, asesulfam potasyum, sorbitol, sakkarin),

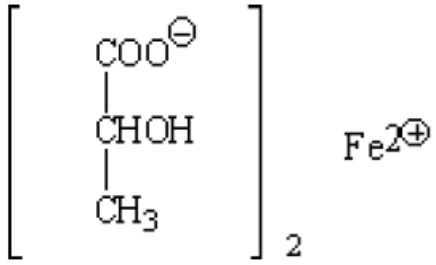
12. Topaklanmayı önleyiciler: Topaklanmayı önleyici ajanlar, Yapışmayı önleyici ajan, Kurutma ajanları (Silikat, Magnezyum-karbonat, Magnezyum-oksit),
13. Un işleme ajanları: Hamur tamamlayıcılar, Hamur kuvvetlendirici ajanlar, Unu parlatıcı ajanlar, Unu geliştiriciler, Unu iyileştirici ajanlar,
14. Antioksidanlar: Kararmayı önleyiciler, Antioksidanlar, Antioksidan sinerjistleri (BHA, BHT, Gallatlar),
15. Asitliği düzenleyiciler: Asitler, Acidifier, Asitliği regüle edenler, Alkaliler, Bazlar, Tamponlar, Tampon ajanları, pH düzenleyici ajanlar (Asetik Asit, Sitrik Asit, Laktik Asit, Malik Asit vb.),
16. Emülgatörler: Gölgeleme ajanları, Kristalizasyon inhibitörleri, Kütle düzenleyici ajanlar, Emülsifiyerler, Yumuşatıcılar, Yüzey aktif ajanlar, Süspansiyon ajanları (lesitin, mono ve digliseritler, sodyum-pirofosfat),
17. Emülsifiye edici tuzlar: Gıdaların imalat sürecinde yağın ayrışmasını engellemek için proteinleri yeniden düzenler,
18. Hacim artırıcılar,
19. İtici gazlar: Gıdanın içinde bulunduğu kaptan dışarı fırlamasını sağlayan hava dışında bir gaz,
20. Kabartma ajanları,
21. Jelleştirme ajanları (ağar ağar, karregenan, guar zamkı),
22. Paketleme gazları: Gıda paketin içine konulmadan önce pakete eklenen, gıdanın bozulmasını engelleyen gaz [20,27,28].

Bu tez çalışmasında, Türk Gıda Kodeksi renklendiriciler ve tadlandırıcılar dışındaki gıda maddeleri tebliğinde birden fazla fonksiyonu olan gıda katkı maddeleri sınıfında yer alan ferrolaktat' ın; 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml)' lik olmak üzere üç farklı konsantrasyonun genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarında en çok tercih edilen model organizmalardan *Drosophila melanogaster*' deki genotoksik etkisi somatik rekombinasyon ve mutasyon testi ve *Drosophila* hemositlerinin hedef hücre olarak alındığı comet assay yöntemiyle araştırılmıştır.

1.2. Çalışmada Kullanılan Ferrolaktat' ın Özellikleri

Türk gıda kodeksi renklendiriciler ve tadlandırıcılar dışındaki gıda maddeleri tebliğinde birden fazla fonksiyonu olan gıda katkı maddeleri sınıfında yer alan ferrolaktat' a Avrupa Birliği' nin bir alt komitesi olan "Scientific Committee on Food" (SCF) tarafından E 585 kodlu isim verilmiştir. Ferrolaktat bir demir ve iki laktat iyonu içeren trihidrat formunda yeşilimsi-beyaz renkte, kristalize-toz şeklinde, tatlı metalik kokusu bulunan, yüksek sıcaklıklarda kolayca çözünme kabiliyetine sahip, kullanıldığı ürüne hoş bir tat veren kimyasal bir bileşiktir. Ferrossülfat, demir tozu, sodyumlaktat ve demirklorürün reaksiyona sokulması ile, amonyumlaktat ve demirsülfatın reaksiyona sokulması ile, laktik asitin doğrudan reaksiyona ile, kalsiyumlaktat ve sodyumlaktatın reaksiyona sokulması ile hazırlanabilmektedir [29].

Ferrolaktatın uluslararası numaralandırma sistemindeki karşılığı: (INS No**) :** 585
Kimyasal adı: Ferrolaktat, Demir (II) laktat, Demir (II) 2-hidroksipropanat
Kurumlar servisi tarafından verilen numarası (C.A.S) : 5905-52-2
Kimyasal Formülü: $C_6H_{10}FeO_6 \cdot xH_2O$, (x = 2 veya 3)
Yapısal Formülü:



Formül Ağırlığı **Dihidrat :** 270.02
Trihidrat : 288.03

Çözünürlük: Su içinde çözünür, etanol içinde pratik olarak çözünmez.
pH: 5.0 - 6.0

JECFA (Gıda Katkı Maddeleri Eksper Komitesi) tarafından ferrolaktat' ın günlük tolere edilebilen miktarı vücut ağırlığı başına 0.8 mg/kg olarak belirlenmiştir [30].

Ferrolaktat alkolde pek güç erimekte olup eriyiği yeşil sarı renktedir, havada esmerleşir, turnusol kağıdını kırmızıya çevirir. Demir bileşiklerinden organizmada en kolay emilebilen ferrosülfat, ferrolaktat, demir tozu ve icra edilmiş demirdir. Demir bileşiklerinin lokal etkileri ferro (Fe++) ve ferri (Fe+++) hallerinde farklılık gösterir. Ferro (Fe ++) bileşikleri nötr halde olup mideye dahil olduklarında kısmen demir-II klorür haline çevrilip, mide ve barsaklarda emilirler ve kan yapan organları uyarırlar. Ferri (Fe+++) iyodları ise kuvvetli asid reaksiyonuna sahip olup, emilimleri söz konusu değildir. Mide ve barsak kanalına dahil olan ferri bileşikleri burada indirgenirler. Ferri bileşiklerinin emilebilmeleri için öncelikle ferro şekline indirgenmeleri gerekir, ancak ondan sonra emilebilirler. Demir iyonları kan yapan organları uyarmakla genel beslenme üzerine uygun tesir yapabilirler. Demir vasıtası ile alyuvarların sayısı artar, eritroblastların eritrositlere çevrilmesi kolaylaşır ve hemoglobin miktarının artmasına hizmet ederler [31].

Demir, oksijeninin organizmadaki dolaşımı için hayati öneme sahip bir mineraldir. Vücudumuzda ortalama 4 g kadar demir bulunmaktadır. Yetişkin bir insanın demir gereksinimi günlük olarak vücuttan atılan miktar olan kadar ortalama 0,9 mg' dır. Hamilelik veya gelişimsel dönemlerde vücuda demir takviyesi yapmak gerekebilir. Demir yetersizliğinde, demir eksikliği anemisi, nefes darlığı, sarılık, kronik baş ağrısı, uyku düzensizliği, aşırı yorgunluk, tırnak kırılmaları, saç dökülmesi görülebilir. Demirin fazlası da vücuttan atılamadığından mide kramplarına, karaciğer sirozuna, bazı hormonal bozukluklara, baş dönmesine, kusmaya, bazı zamanlarda komaya sokmaya kadar gidebilir [32].

Ferrolaktat; şekerlemeler, soslar, bisküvi, süt tozu, makarna ve bazı içecekler gibi birçok gıda ürünlerinde ve Federal Gıda İlaç ve Kozmetik Yasasına uygun olarak bebek mamasında aynı zamanda olgun zeytinlerde renk sabitleyici (renk tutma ajanı), boyama, asit düzenleyicisi veya demir takviyesi için kullanılırlar. Ferrolaktat' ın hava, ısı ve ışığa maruz kalması durumunda oksijen ile kimyasal reaksiyona girerek kolayca okside olabileceğinden, oda sıcaklığında tutulması gerekmektedir [29,33].

1.2.1. Ferrolaktat' ın Maksimum Kullanım Miktarları

Ferrolaktat; Bakliyat ürünlerinde 120-240 mg/kg, alkollü-alkolsüz içeceklerde 50-100 mg/kg, süt ürünleri ve bebek mamalarında 300-500 mg/kg, Sofra tuzu ve bonbon üretiminde 4800-6000 mg/kg, FAO tarafından ferrolaktat' ın bitkilerde (mantarlar, kök ve tuberler, bakliyatlar), sirke, yağ, salamura ve soya fasulyesi sosunda maksimum kullanım miktarı 150 mg/kg olarak belirlenmiştir [61]. Benzoik asit (E210), Sodyum benzoat (E211), Ferrolaktat (E585), Feroglukonat (E583), Monosodyum glukomat (E621) gibi maddelerin gıdalarda kullanımlarının yüksek olması nedeniyle tüketicilerde alerji, astım, sinir bozukluğu, çocuklarda hiperaktivite, tümör oluşumlarına, gastrointestinal bozukluklara ve zehirlenmelere yol açabileceği belirtilmektedir [33].

Türk Gıda Kodeksine göre "Oksidasyonla karartılan zeytinlerin" üretiminde renk stabilizasyonu amacıyla kullanımına izin verilen katkı maddesi E-585 kodlu ferrolaktat'dır ve kullanım miktarları 150 mg/kg sınırlandırılmıştır. Zeytinin meyve etinde toplam demir miktarı 150 mg/kg 'yi geçmemelidir. Zeytinin kararan renginin sabitlenmesi için son yıkama suyuna % 0.1 oranında renk sabitleyicisi ferroglukonat veya % 0.05 oranında ferrolaktat eklenerek zeytinin rengine olumlu etki ettiği bilinmektedir [34].

1.3. Çalışmada kullanılan *Drosophila melanogaster* İle İlgili Genel Bilgiler

Genetik çalışmalar genellikle model organizmalar ile çalışılarak yapılır. Genetik çalışmalarda kullanılacak iyi bir model organizma; kolay büyümeli, kısa sürede nesil verebilmeli, kolayca mutasyona uğratılabilmeli ve kolay çaprazlanabilmelidir [35].

Drosophila melanogaster ilk defa 1909 yılında T.H. Morgan tarafından genetik çalışmalarda kullanılmıştır. *Drosophila melanogaster*' in genetik çalışmalarda tercih edilmesini sağlayan birçok özelliği vardır. Bunlar; kültür ortamında kolay/ekonomik çoğaltılabilmeleri, çok sayıda yavru döl vermeleri, yaşam döngülerinin kısa oluşu, yapılarının küçük yapılı oluşu, az sayıda ve kolay incelenebilen kromozoma sahip olmaları, saf döl olarak saklanabilmeleri, üçüncü evre larvaların tükürük bezlerinde dev kromozomların bulunması, birçok mutant karektere sahip oluşudur [36].

Bu zamana kadar tanımlanmış insan hastalık genlerinin % 60' dan fazlası şaşırtıcı bir şekilde meyve sineği ve nematod genleri ile benzerlik göstermektedir. Sonuçta

insanlar *Drosophila melanogaster*' den daha fazla gene sahiptirler ancak ortak gen benzerlikleri vardır [37].

İnsanlar ile benzer genetik mekanizmalara sahip olması *Drosophila melanogaster*' i genetik toksikoloji çalışmalarında kullanılabilecek bir model organizma haline getirmiştir.

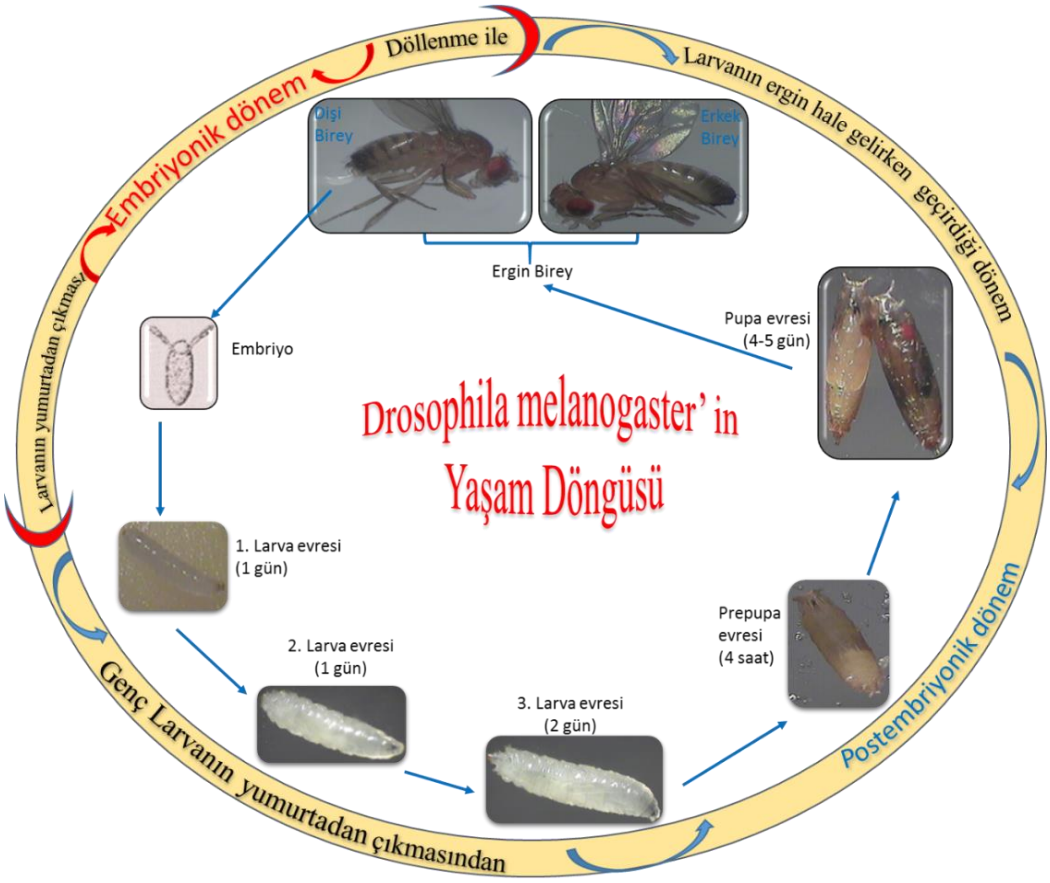
1.3.1. *Drosophila melanogaster*' in Sistematikteki Yeri

Drosophila melanogaster hayvanlar aleminin İnsecta sınıfına dahil olan diptera takımının Drosophilidae familyası içinde yer alan larvaları ekşiyen meyveler üzerinde geliştiği için meyve sinekleri adı ile de bilinen tam başkalaşım gösteren (holometabol), diploid kromozomlu dört çift kromozom taşıyan bir canlıdır [38].

Alem : Animalia
Şube : Arthropoda (eklembacaklılar)
Altşube : Mandibulata-Antennata
Sınıf : İnsecta- Hexapoda (böcekler-altıbacaklılar)
Alt sınıf : Pterygota (kanatlılar)
Üst takım : Mecopteroidea (uzun kanatlılar)
Takım : Diptera (çift kanatlılar)
Alt takım : Brachycera (kısa antenliler)
Aile : Drosophilidae (sirke sinekleri)
Cins : *Drosophila*
Tür : *Drosophila melanogaster*

1.3.2. *Drosophila melanogaster*' in Yasam Döngüsü

Drosophila melanogaster'de gelişmiş hayvanlar ve insan gibi ökaryotik bir canlıdır. *Drosophila melanogaster* sineklerinin embriyonik gelişimi optimum şartlarda ve 25°C de yumurtaların ergin hale gelmesi için gerekli süre yaklaşık 9-11 gündür. *Drosophila melanogaster* hayat döngüsünde dört farklı evreye sahiptir (Şekil 1.1). Yumurtayı takiben holometabol (tam metamorfozlu) oluşlarından dolayı bütün dipterler için aynı olan larva, pupa ve ergin dönemleri tüm hayat siklusunu oluşturmaktadır [39].



Şekil 1.1. *Drosophila melanogaster*' in yasam döngüsünün gösterilmesi (Orjinal)

Drosophila melanogaster'in yaşam döngüsündeki zaman dilimeleri; atasal soy, ömür uzunluğu; ışık şiddeti, sıcaklık, beslenme, populasyon yoğunluğu, çiftleşme, radyasyon, *Drosophila melanogaster* zararlıları ve nem faktörleriyle değişiklik gösterebilmektedir.

D.melanogaster ergin bir dişi tüm yaşamı boyunca 300' e kadar varan sayıda yumurta bırakabilir. Genellikle bunların % 95' i olgunlaşıp açılabilir. Diğer böceklerde olduğu gibi *Drosophila melanogaster*'de de gelişme iki aşamada olur (Şekil 1.1.). Birincisi embriyonik dönem yani yumurtanın döllenmesiyle başlar ve genç larvaların yumurtadan çıkmasına kadar devam eden sürece verilen isimdir. İkinci dönem ise postembriyonik dönemdir ve genç larvanın yumurtadan çıktığı andan itibaren başlayarak, larvanın ergin hale gelinceye kadar geçirdiği bütün değişiklikleri içeren evreye verilen isimdir [38].

1.3.2.1. Yumurta

Drosophila melanogaster yumurtaları oval şekilli ve görünüşlüdür. *Drosophila melanogaster* yumurtasının boyu ortalama 0,5 mm uzunluğundadır. Arteriör tarafta türlere göre sayısı değişebilen flamentler bulunur. Flamentler yumurtanın bırakıldığı yumuşak zemine batmasını engeller ve hayati öneme sahip oksijenin alınmasını sağlar. *Drosophila melanogaster* yumurtaları 25 ^{0}C de 22-24 saate açılarak larva yumurtadan çıkar [36].

1.3.2.2. Larva

Larvalar yumurtadan çıktıktan sonra besiyer içerisinde sürekli beslenerek gelişir. Larval gelişim evresinde larvanın kütiküla tabakası iki kez atılır ve yenisi ile değiştirilir. Bu olaya gömlek değiştirme denir. İki gömlek değiştirme arasındaki evre instar evresidir. Larval gelişim evreleri şöyledir.

* Birinci Larval Evre / İnstar (L1) :1 gün (Yumurtadan açılması ve ilk deri/gömlek değiştirme aşaması)
* İkinci Larval Evre / İnstar (L2) : 1 gün (ikinci kez deri/gömlek değiştirme aşaması)
* Üçüncü Larval Evre / İnstar (L3) : 2 gün (pupa oluncaya kadar ki evredeki aşama) [36].

Embriyo gelişimi sırasında imajinal disk hücreleri olarak adlandırılan yapılar gözlenir. Bu imajinal disk hücreleri larval evreler boyunca pupa evresine kadar mitoz bölünme yoluyla çoğalır. Pupa evresinde bu hücreler farklı organları oluşturur. Larvalar beslenmelerini tamamladıktan sonra yaklaşık 0,3 mg olduktan sonra besiyerden kuru ortamlara geçerler [40].

1.3.2.3. Pupa Evresi

Üçüncü Larval evre sonrası prepupa evresinde larvalar besiyerden ayrılarak kuru yerlere tırmanmaya başlar. Burada dış zar sarı-kahve renkte sabitleşerek pupalaşır [41]. Bu evre yaklaşık 24 saatttir [42].

Pupa ergin hale gelinceye kadar sertleşmiş kütiküla içerisinde hareketsiz kalır, bu kütikiladan oluşan yapıya puparyum adı verilir. Puparyum, larval gelişimin son saatlerinde ortaya çıkan ektisteroid hormonunun artışı ile oluşur. İlk etapta beyaz ve yumuşak yapılı olan puparyum, yaklaşık iki saat sonra kahverengiye dönüşür. Pupa

aşamasında bir erginin organlarının gelişmesi için gerekli olan dönüşümler bu evrede 25 ^{0}C de % 40-60 nem ortamında 4-5 gün sürer [36,40].

Pupanın rengi ergin sineğin çıkmasına yakın koyulaşarak kahverengiye dönüşür. Ergin birey pupadan çıkmadan yaklaşık bir gün önce, kıvrılmış durumda olan kanatlar iki koyu eliptik yapı olarak açıkça görülebilir. Göz pigmentleri ise pupada bile fark edilecek ölçüde Şekil 1.2. de görüleceği üzere belirgindir [43].



Şekil 1.2. *Drosophila melanogaster* ergin bireyinin pupadan çıkmadan önceki görünüşü (Orjinal)

1.3.2.4. Ergin

Gelişimin tamamlanmasının ardından ergin birey pupadan pupa kılıfının arteriorunu delerek çıkar. Bireyler ilk önce açık renkli ve uzun abdomenlidir. Ayrıca kanatları henüz açılmamış durumdadır. Birkaç saat sonra kıvrık olan kanatları açılmaya başlar ve ergin bireyde pigmentasyon gerçekleşerek normal koyu rengini alır. *Drosophila melanogaster* erkek bireyler pupadan çıktıktan hemen sonra eşeysel olgunluğa ulaşır. Dişi bireyler ise pupadan çıktıktan yaklaşık 5-6 saat sonra eşeysel olgunluğa erişir [36,40].

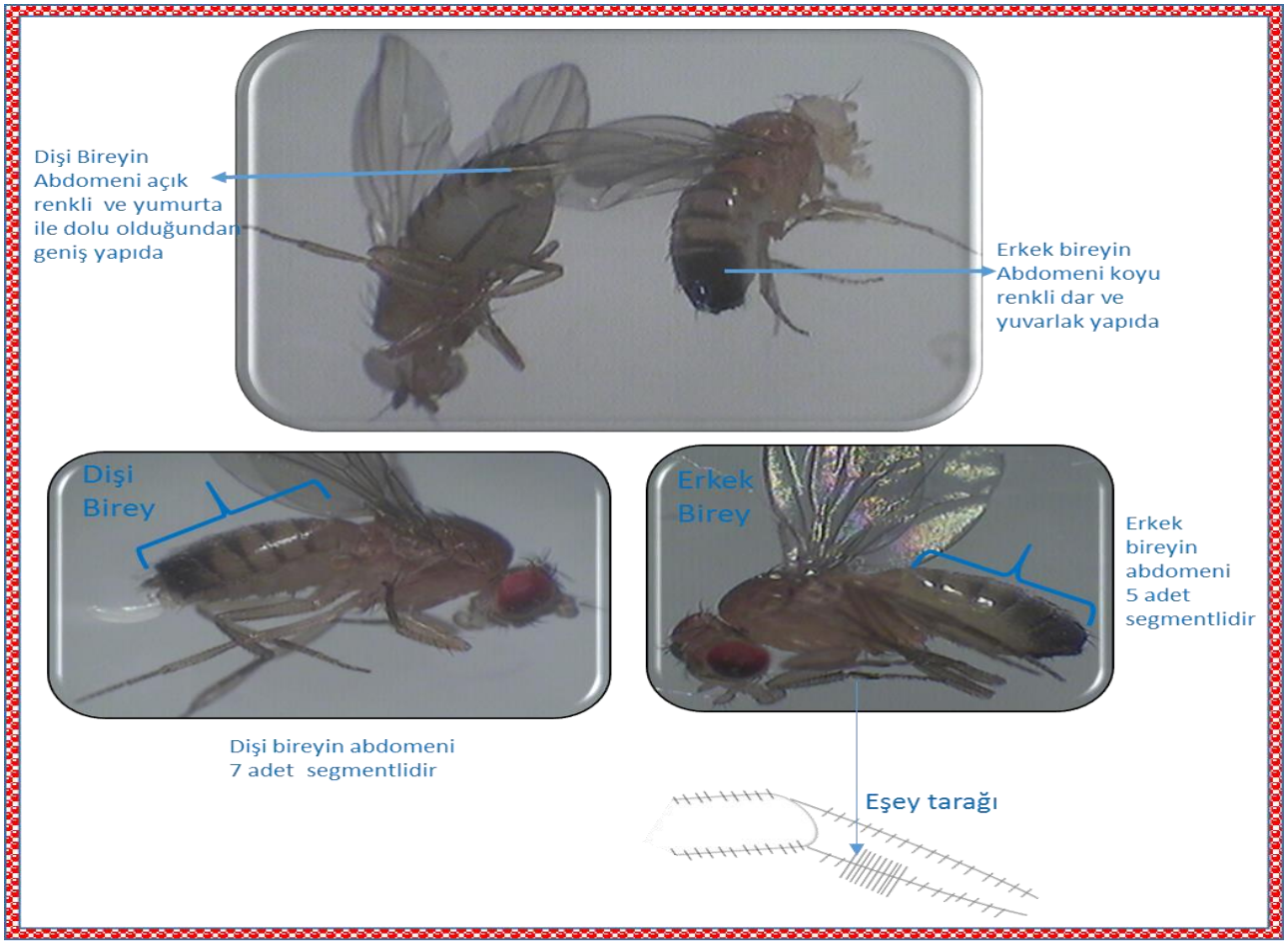
Bu yüzden SMART testi için kontrollü çaprazlama yapılabilmesi ve döllenmeden virgin halde toplanması amacıyla flare soyundan dişi bireyler kültür ortamlarından eşeysel olgunluğa erişmeden önce 4’ er saatlik aralıklar ile toplanmıştır.

Dişiler virgin olmasına veya çiftleşmesine bağlı olmaksızın yumurta bırakırlar ancak döllenmemiş yumurtalar açılmaz. Dişiler pupadan çıktıktan sonra 2. veya 3. günde yumurtlamaya başlarlar [38].

Drosophila ergin yapılarının birçoğu imaginal disklerden gelişir; bunlar erken larva gelişimi sırasında saptanır. İmaginal diskler ergin sinekte spesifik bir organ olarak farklılaşır. Bu ergin yapılar; ağız parçaları, antenler, gözler, kanatlar, halterler, bacaklar ve dış genital organları içerir. İmaginal disk hücreleri çevresindeki larva hücreleri farklılaşsa da larval gelişim süresince embriyonik bir durumda kalır. Diğer yapılardan olan sinir sistemi, barsak ve kütikül imaginal disklerden gelişmez. Her imaginal disk, birinci larva döneminde gelişir ve 20-50 hücreden oluşmuş duruma gelince, kendisine verilen göreve göre ergin yapıyı belirtmek üzere zaten programlanmış durumdadır. Bu andan sonra, her diskteki hücrelerin sayısı larva döneminin sonuna kadar mitotik bölünme ile artar ve böylece disk başına birkaç bin hücreye ulaşılır [44].

Dişi ve erkek *Drosophila melanogaster* arasında morfolojik olarak farklılıklar vardır (Şekil 1.3.). Erkek bireylerin birinci çift bacağının ilk tarsal seğmenti üzerinde 10 adet kısa kalın kıldan oluşan eşey tarağı adı verilen bir yapı vardır. Eşey tarağı dişilerde yoktur. İkinci ayırt edici özellikte abdomenlerinin şekli ve rengidir. Dişiler 7 abdomen segmentine sahip olup abdominal kısımları koyu renkli iken, erkeklerde 5 abdominal seğment var olup abdominal kısımları açık renklidir [45]. Dişinin yaşlanması ve devamlı yumurta gelişiminden dolayı abdomenleri yumurtalarla dolarak genişlerken, erkeğin abdomeni dişeye göre daha dardır. Ayrıca erkeklerin abdomen arkası siyahtır. Dişide ise açık ve koyu bantlar uç kısma kadar uzanır [41]. Mikroskobik incelemelerde dış genital yapıda farklılıklar gözlenir.

Ergin bireylerin ortalama yaşam süreleri 40-50 gündür. Ancak 80-90 gün yaşayan ergin bireylerin olduğu gözlenmiştir [46].



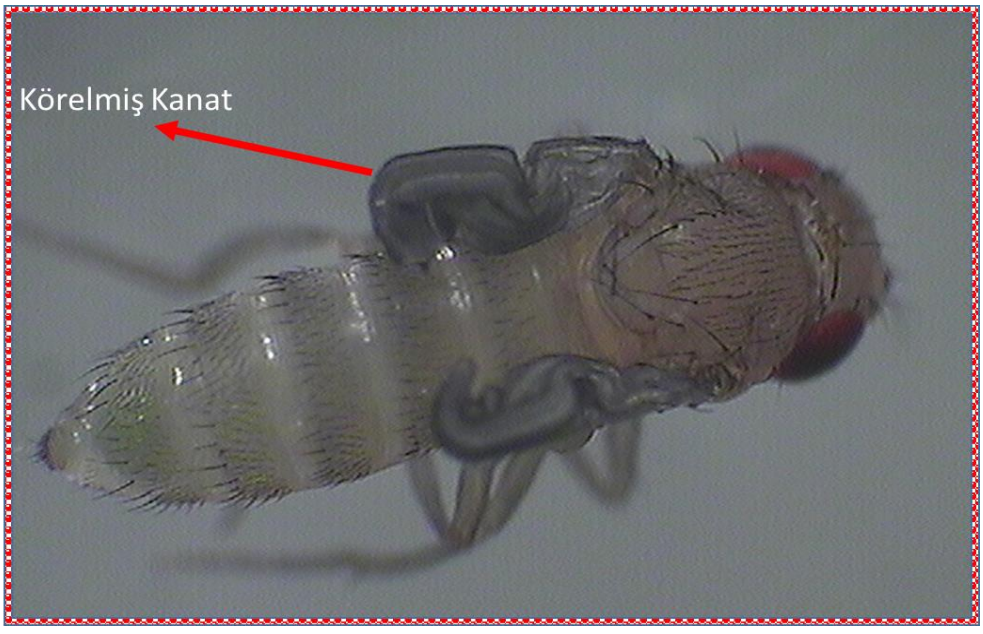
Şekil 1.3. Dişi ve erkek *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin bazı ayırt edici özellikleri (Orjinal)

1.4. Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART)

Somatik rekombinasyon ve mutasyon testi; göz benek testi ve kanat benek testi olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki sistemde de nokta mutasyon, delesyon, kromozom bozuklukları tespit edilebilir. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testi embriyonik gelişim sırasında farklı imajinal disk hücrelerine çeşitli maddelerin uygulanmasını esas alır. İmajinal disk hücreleri mitozla çoğalmaktadırlar ve birinci larva evresinde yaklaşık olarak 50-100 kadarken, üçüncü larva evresinde (72 saat) bu sayı 24.400' e ulaşır [36].

Üçüncü larva evresinde uygulanan maddenin etkisi imajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklik ile fenotipte kendisini ergin sineklerin gözlerinde veya kanatlarında mutant hücre grupları ile kendisini gösterir, SMART testi uygun gen işaretlerinin heterozigotluğunun kaybının tanınması ile geliştirilirmiş, tek bir kuşakta sonuç alınabilen, tek bir sinekle çok sayıda hücrenin analizinin yapılmasına olanak sağlayan, hedef genleri kolay tespit edilebilen, sonuçların kolayca değerlendirilebilen, hızlı, ekonomik ve güvenilirliği kanıtlanmış in vivo bir test sistemdir [47,48,49].

Mutasyona uğramış *Drosophila melanogaster* bireylerinin kanat şekillerinde, büyüklüğünde ve mutasyonların etkilerinin fenotipteki görünüşlerinde değişiklik görülebilir. Şekil 1.4. de İmajinal disk hücrelerinde meydana gelen genetik değişiklik fenotipte kendisini, ergin sineğin kanatlarında mutant oluşturarak göstermiştir.

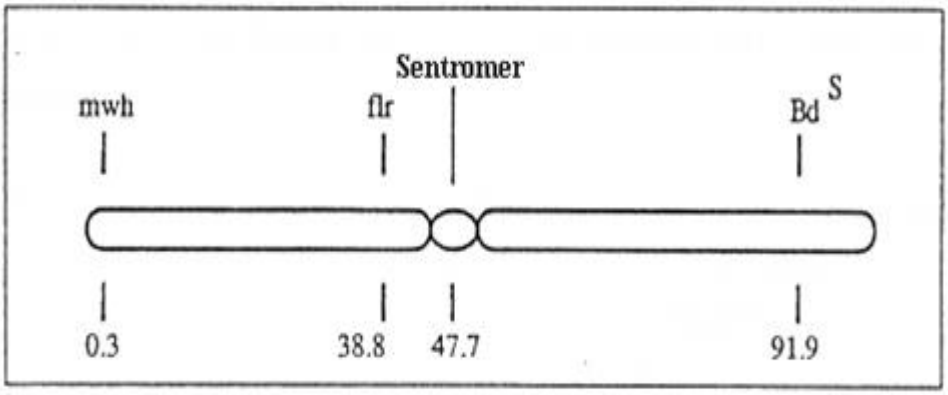


Şekil 1.4. Mutasyona uğramış *Drosophila melanogaster,* kanatları körelmiş ve abdomenin yarısına kadar uzanmış halde (Orijinal)

1.4.1. Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi

Bu sistem 1984 yılında Graf ve ark. tarafından geliştirilmiş olup *Drosophila melonogaster*' in flare (flr^3) ve multiple wing hair (çoklu kanat kılı, mwh) belirleyici genleri taşıyan bireylerin çaprazlanması sonucu elde edilen 3. evre transheterezigot larvaların kanat imajinal disk hücrelerinde oluşan genetik değişimlerin ergin bireylerin kanat fenotipinde gözlenmesi ve değerlendirilmesi esasına dayanır. Bu test ile aynı anda nokta mutasyonu, delesyon, ayrılmama gibi mutasyon çeşitlerinin ve rekombinasyonun fenotipte gözlenebilmesine imkan sağlamaktadır [50,51].

Drosophila melanogaster' de somatik mutasyon ve rekombinasyonları belirleyebilmek için 3. kromozom üzerindeki iki belirleyici gen flare (flr^3, 3-38,8) geni ve multiple wing hair (mwh, 3-0,3) geni kullanılır (Şekil 1.5.). Üçüncü kromozomun en büyük kromozom olması ve kullanılan genler arasındaki mesafenin de oldukça uzak olması rekombinasyon ve mutasyonların büyük bir aralıkta incelenmesine olanak sağlar [52].

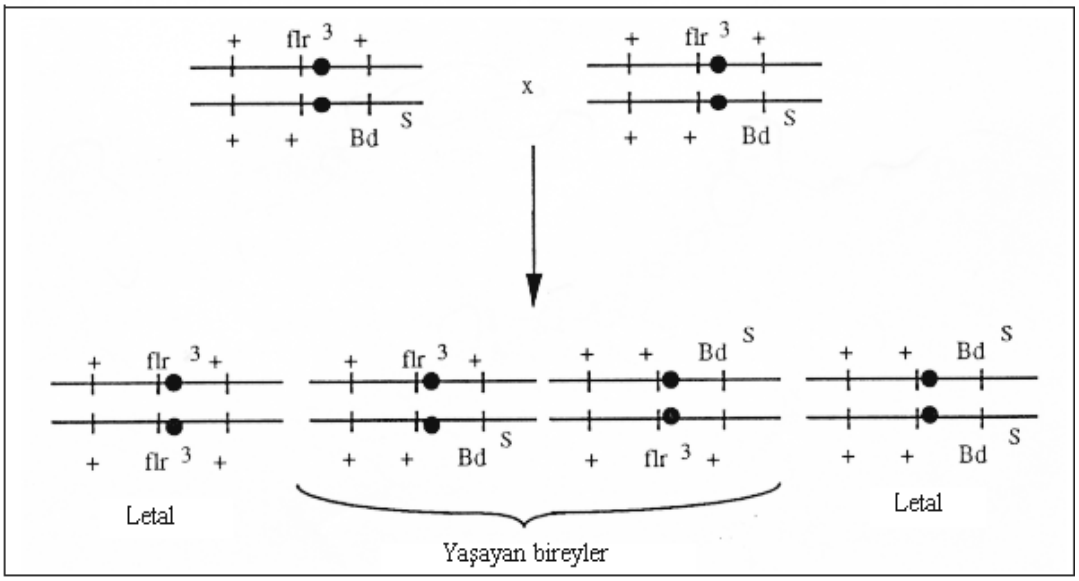


Şekil 1.5. Drosophila kanat somatik mutasyon testinde kullanılan belirleyici genlerin üçüncü kromozom üzerindeki konumları [36,52]

1.4.2. Kullanılan Hatların Genel Yapısı

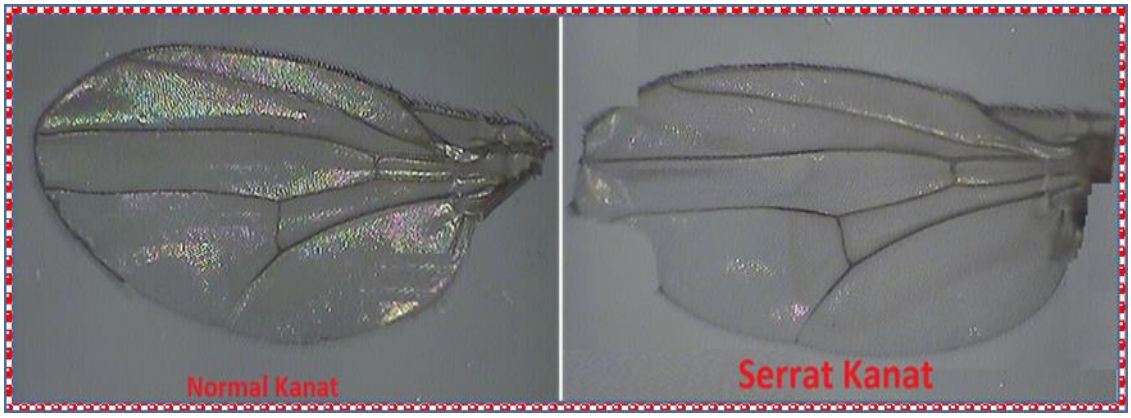
mwh/mwh: Bu mutant soy mwh (çoklu kanat kılı) mutasyonunu taşımakta ve resesif bir gen olup mutasyonu üçüncü kromozomun sol kolun uca yakın bölümünde yer alır. Homozigot mwh soyu olarak yaşatılabilir ve bu durumda kanat hücrelerinde hücre başına bir kanat kılı (trikom) olması gerekirken çoklu kanat kılı oluşur [42].

flr^3 / ln (3LR) TM3, ri p^P sep l (3) 89Aa bx^{34S} e^S Bd^S : Bu mutant soy flare (flr^3) mutasyonunu taşımakta ve flr^3 kanat kıllarının şeklini etkileyen resesif bir mutasyondur. flr^3'ün üç mutant aleli bilinmektedir ve hepsi de homozigot letaldir (Şekil 1.6.). Ancak kanat imaginal disklerindeki homozigot hücreler yaşayarak mutant kanat hücrelerine gelişir. Homozigot letalite ile kanat kenarlarının testere dişi şeklinde olmasına neden olan dominant bir mutasyon olan Bd^s heterozigot olarak tutulur. flr^3 fenotipinde kanatlardaki kıllar normal, düz ve uzun kıllar şeklinde iken, mutasyon halinde kalın ve düzgün olmayan kısalmış, nokta veya koyu renkli balon şeklinde kıllar yapılar olarak kendisini gösterebilir [52,53].



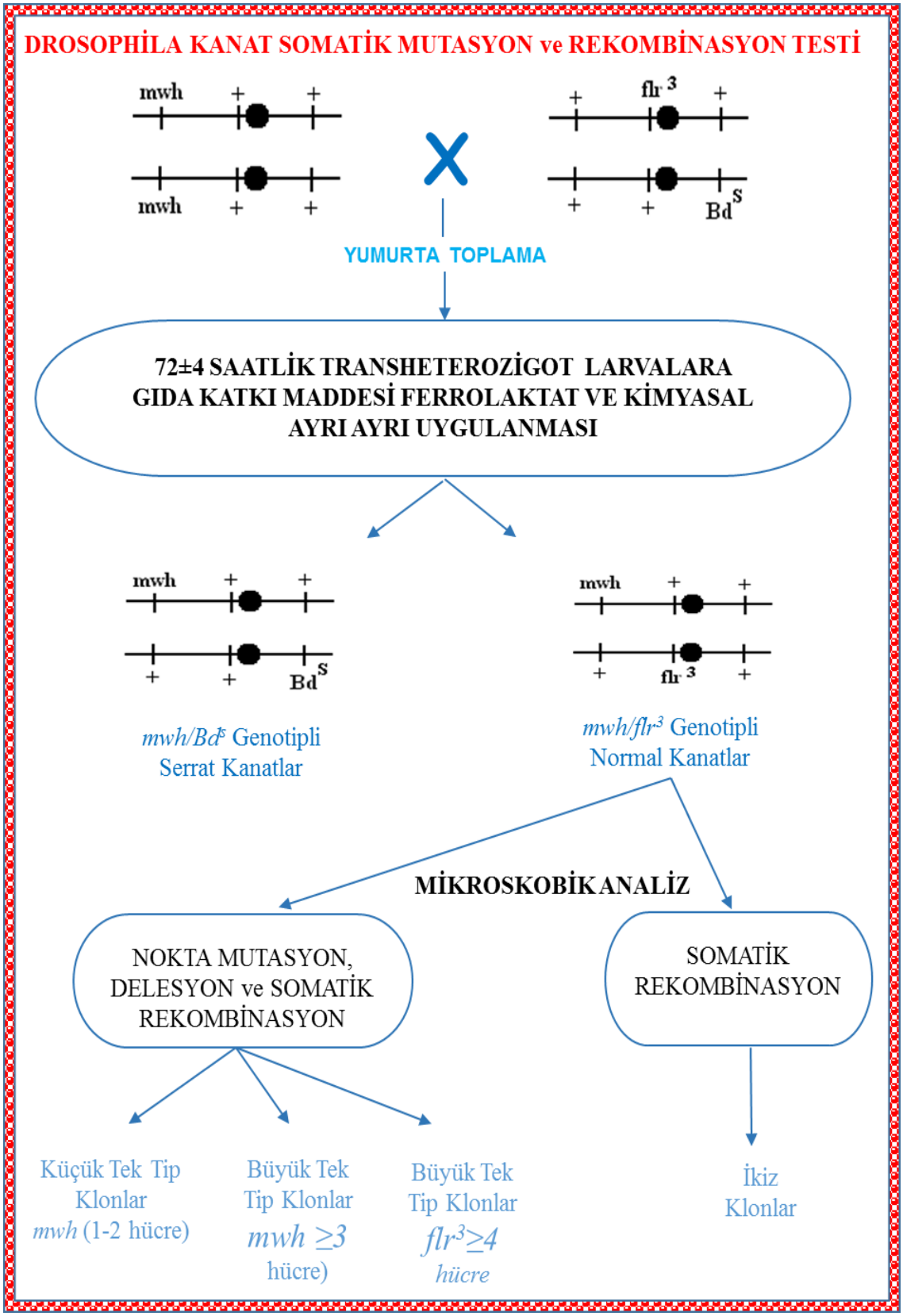
Şekil 1.6. *flr^3 / TM3, Bd^S* bireylerindeki homozigot letal etkiler [52].

Normal kanatlar düzgün iken Bd^S (Beaded Serrat) genini taşıyan ergin bireylerin kanatlarının kenarları düzgün değildir (Şekil 1.7.). Homozigot halde letal etki gösteren dominant *Bd^S* geni, TM3 dengeleyici kromozomunun üzerinde yer alır ve böylelikle TM3 dengeleyici kromozomuna sahip bireyler düzgün olmayan kanat kenarlarının incelenmesiyle diğer bireylerden ayırt edilebilir. [36,52]. *Bd^S* bireyler kanat kenarlarının testere şeklinde görünümlü olmasıyla ayırt edilir.



Şekil 1.7. Dengeleyici kromozom taşımayan normal kanat (soldaki) ve dengeleyici kromozom taşıyan serrat kanat (sağdaki) fenotipleri (Orijinal)

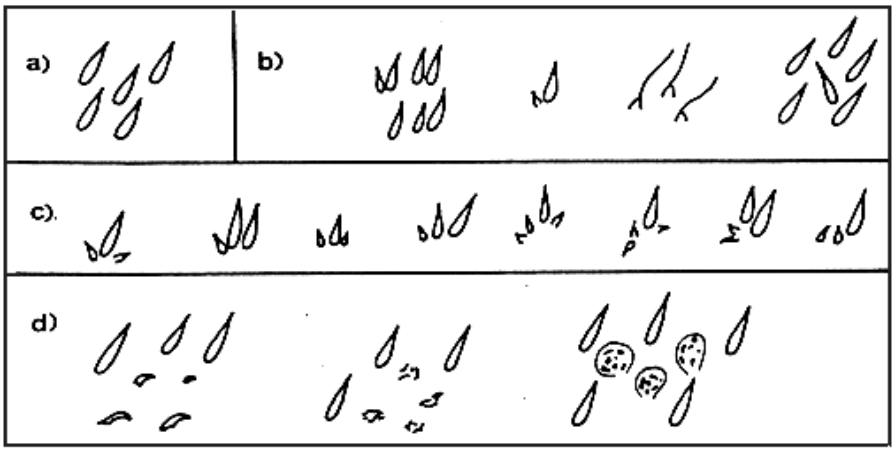
Normal kanatlılar hem mutasyon hem de rekombinasyon sonucu oluşan mutant klonlarını içerirken, düzgün olmayan kenarlı serrat kanatlar (mwh/TM3,Bd^S) dengeleyici kromozomun rekombinasyonu baskılaması sonucu sadece mutasyon sonucu oluşan klonları içerdiklerinden kanat SMART testinde değerlendirme aşamasında, kanat preparatları hazırlanırken kanatlar morfolojilerine göre normal (düzgün) kanatlı ve serrat kanatlılar olmak üzere iki gruba ayrılarak inceleme yapılır.



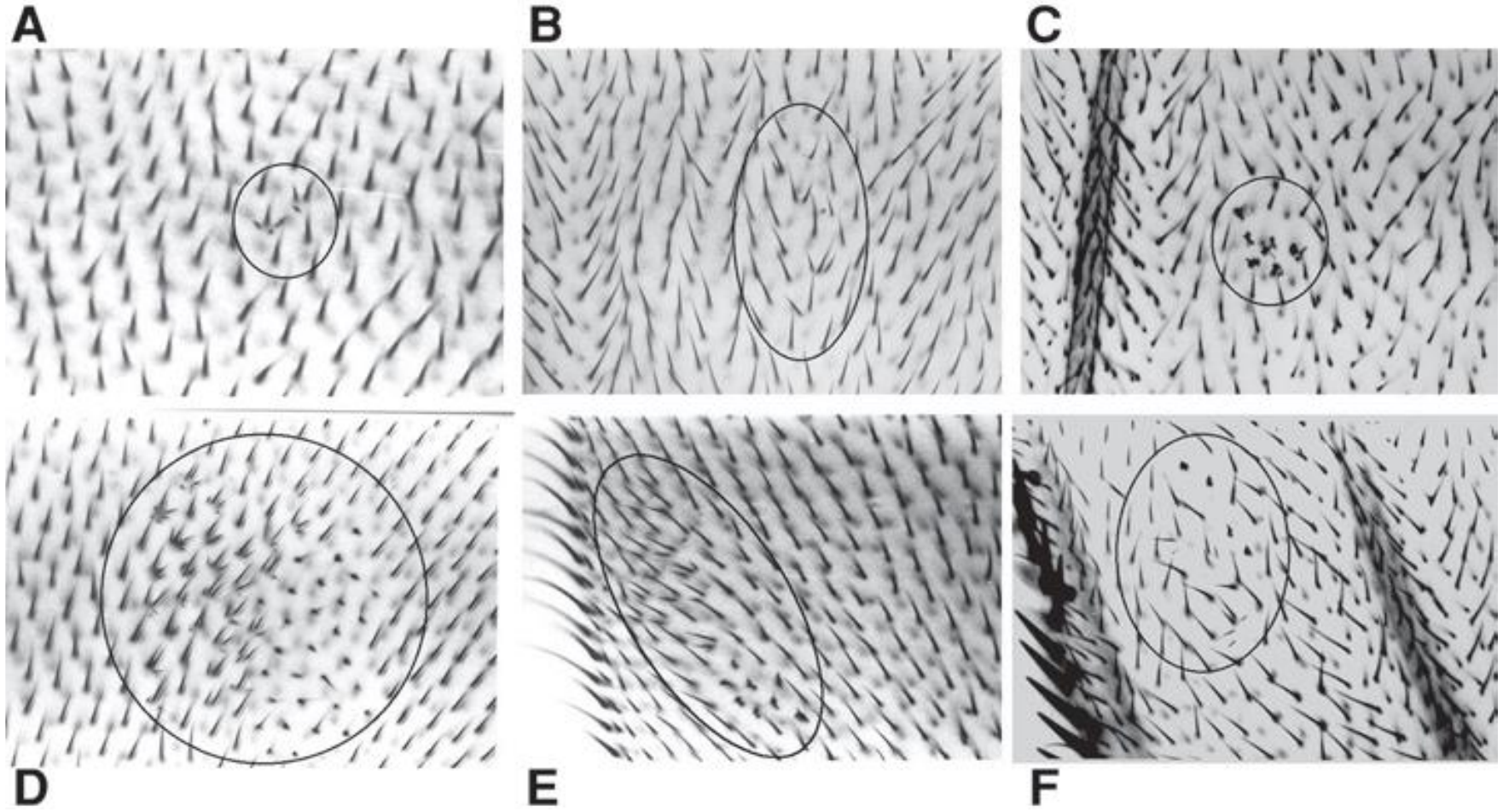
Şekil 1.8. *Drosophila melanogaster*' de kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin uygulanmasının şematik olarak gösterilmesi [54].

Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon testinde; tekli benekler mwh veya flr^3 fenotipindeki hücrelerden oluşur. Tekli beneklerde küçük tek tip büyük tek tip diye sınıflandırılır. Küçük tek tip klonlar yalnızca 1 veya 2 tane mwh hücrelerinden oluşan klonlardır. Büyük tek tip klonlar ise flr^3 ve mwh hücre klonlarından da oluşabilir. 3 veya daha fazla sayıda mwh mutant hücre veya 4 veya daha fazla flr^3 mutant hücrelerden oluşan klonlar büyük tek tip klon olarak adlandırılır (Şekil 1.9. ve Şekil 1.10.). flr^3 klonlarının 4' ten az sayıda olması halinde sayıma dahil edilmemesinin nedeni; önceki yıllarda yapılan çalışmalarda dörtten daha az sayıda gözlenen sadece flr^3 fenotipteki trikomların oluşturduğu klonların varyasyon nedeniyle ortaya çıktığı, bu nedenle flr^3 fenotipteki klonlar için dört ve daha fazla sayıdaki hücrelerin büyük tek tip klon olarak adlandırılması gerektiği belirtilmiştir. mwh hücre klonları ve flr^3 hücre klonlarının her ikisinin yan yana yer aldığı klonlar ise İkiz klon olarak adlandırılır [55].

Kanat preparatlarının mikroskobik analizi esnasında ikiz klonların yan yana bulunması hali için dikkat edilmesi gereken hususlardan birisi mwh hücre klonları ile flr^3 hücre klonları yan yana da bulunabilir ki bu durumda ikiz klon olarak adlandırılır. Ancak komşu iki klon da olabilir bu durumda farklı iki klon olarak değerlendirmeye tabi tutulur. Yan yana klonlar mı yoksa komşu iki klon mu olup olmadıkları ayrımı Graf ve ark. 1984 [52] yılında yapmış oldukları çalışmada göz önünde bulundurulmuştur. mwh ve flr^3 hücrelerinin sınıflandırılmasında, iki klon arasında üç yada daha fazla sayıda yaban tip trikom hücre sırası varsa bunlar iki farklı klon olarak değerlendirmeye tabi tutulması gerektiği belirtilmiştir.

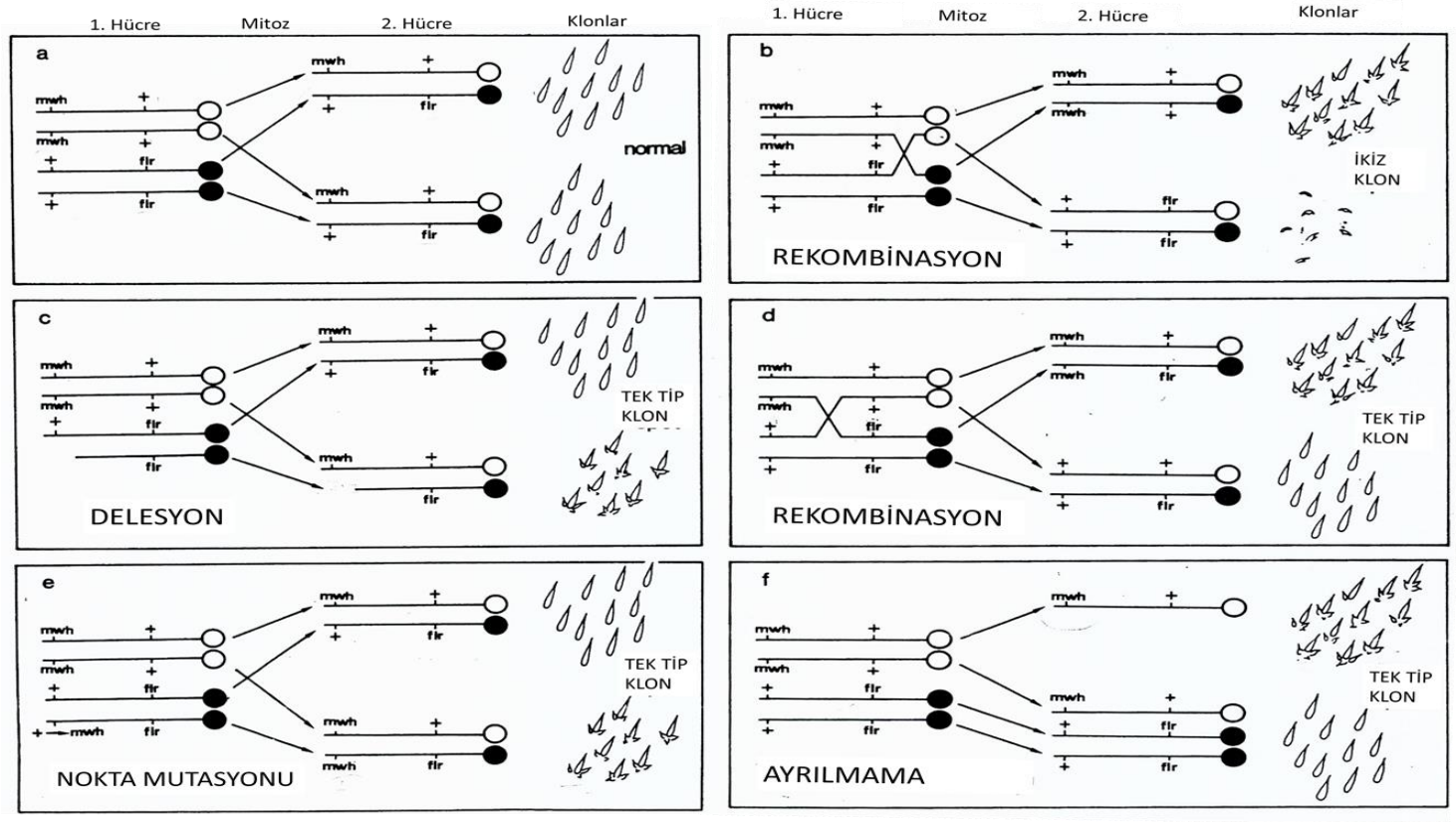


Şekil 1.9. Kanat trikomlarının görünümü a) normal; b) farklılaşmış fakat ne *flr^3* ne de *mwh* olarak sınıflandırılmayacak trikomlar; c) *mwh* trikomlar; d) *flr^3* genotipine ait trikomlar [36,52].



Şekil 1.10. *D. melanogaster*' e ati farklı klon türleri: (A) mwh fenotipine ait iki küçük tekli benek, (B)mwh fenotipine ait 5 büyük tekli benek, (C) flr fenotipine ait altı büyük benek (D) flr fenotipine ait 30 benek ve mwh fenotipine ait 30 benekli ikiz klon (E) flr fenotipine ait 8 benek ve mwh fenotipine ait 14 benekli ikiz klon (F) flr fenotipine ait 4 benek ve mwh fenotipine ait 4 benekli ikiz klon [56]

Kanatlardaki mutant klonların farklı tipte ortaya çıkmasının nedeni, farklı genetik mekanizmaların gerçekleşiyor olmasındandır (Şekil 1.11.). Tekli klonlar *mwh* klonların oluşması iki işaret gen (*mwh* ve *flr*^{3}) arasındaki mitotik rekombinasyon (nokta mutasyon, delesyon, ayrılmama ve rekombinasyon) sonucu oluşurken; gerek *flr*^{3} klonlar gerek ikili klonlar 3. kromozomun sentromeri ve *flr*^{3} geni arasındaki mitotik rekombinasyon sonucu oluşmaktadır [57,58,59].



Şekil 1.11. *mwh/flr*^{3} genotipindeki bireylerde görülebilecek genetik anomali şekilleri [52]

1.5. Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi

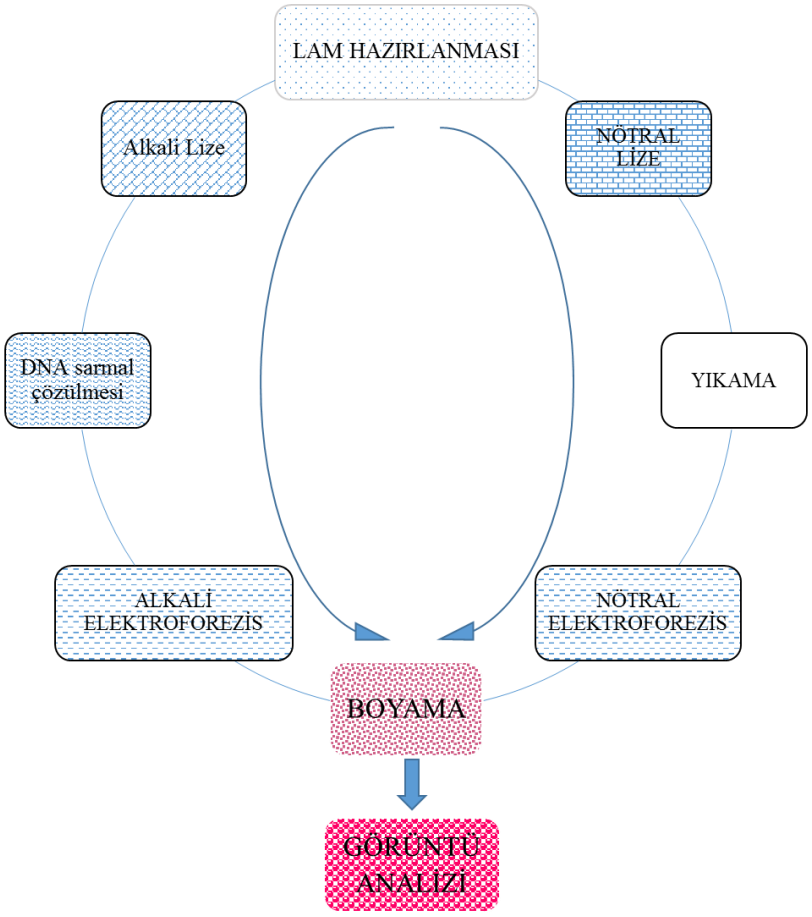
DNA tek sarmal kırıklarının tespiti ilk kez Rydenberg ve Johanson tarafından tespit edilmiştir. Hücrelerin lam üzerindeki agaroz jele gömülerek sabitlenmesi akabinde hafif alkali ortamda bekletilmek suretiyle DNA sarmalının açılmasının sağlanarak membranların parçalanması ve proteinlerden ayırılması sağlanmıştır. Hücreler daha sonra nötralize edilip, DNA akridin turuncusu kullanılarak boyanmıştır. DNA hasarının oranını ise; tek sarmal DNA kırıklarına kırmızı floresansın, çift sarmal DNA kırıklarına yeşil floresanın oranına göre hesaplamışlardır [60].

Ostling ve Johanson, DNA' da meydana gelen hasarın daha duyarlı saptanabilmesi amacıyla 1984 yılında nötral tekniği geliştirerek mikrojel elektroforez yöntemini bulmuşlardır. Ostling ve Johanson hücreleri, agaroz jel içine gömerek, yüksek tuz ve deterjanla liziz çözeltisinde bekletmek suretiyle membranların parçalanması sağlamış, ardından DNA'ları nötr bir ortamda elektroforez işlemine tabi tutarak DNA' ları anoda doğru yürütmüşlerdir. Çok sayıda zincir kırığı bulunan DNA' ların az sayıda zincir kırığı bulunan DNA' lara göre daha hızlı anoda doğru göç ettiğini, göç eden bu DNA' ların etidyum bromür ile boyanarak, DNA' da meydana gelen hasarı florasansın yoğunluğuna göre hesaplamışlardır [61].

DNA' daki çift sarmal kırıkları nötral koşullarda tespit edilirken, tek zincir kırıkları tespit edilemez. DNA' da hasar oluşturan pek çok ajanın da DNA çift sarmal kırığına göre 5-2000 kat daha fazla tek sarmal kırığı meydana getirdiği bilindiğinden, alkali koşulların DNA hasarını belirlemede nötral koşullardan daha etkili olduğu anlaşılmıştır [62].

DNA tek sarmal kırığını ölçen tekniklerde DNA çift sarmalının açılması gerekir. Denaturasyon, çift sarmalın çözülmesi ve tek sarmal kırıklarının yanında alkali ortamda açığa çıkan kırıkların tespiti için de yüksek pH' dan yararlanılır [60].

1988 yılında Singh ve ark. elektroforezi kuvvetli alkali ortamda pH>13 te uygulayarak, *"tek sarmal kırıkları"* denilen ve sadece alkali ortamda ortaya çıkan DNA tek sarmal kırıklarının tespit edilmesine olanak sağlayan günümüzde de bilimsel çalışmalarda çok yaygın olarak kullanılan ve uygulanan bir yöntem haline getirmişlerdir [63].



Şekil 1.12. Alkali ve nötral yöntemler için genel deney protokolü [64].

DNA' daki tek sarmal ve çift sarmal kırıklarının tespit edilmesinde kullanılan yöntemdeki farklılık, Şekil 1.12. de de görüldüğü gibi DNA tek sarmal kırıkları için alkali yöntemin kullanılması, DNA' daki çift sarmal kırıklarının tespiti için ise nötralize elektroforezin uygulanmasıdır [60].

Eloktroforez ortamındaki nötral veya alkali ortam uygulanması sonucunda DNA hasarının tespit edilmesinde kullanılan cometlerin görünümlerinde farklılıklar olduğu;

- Cometlerin nötral elektroforez ortamında tek parça halinde bir kuyruğa sahip olduğu gözlemlenirken, alkali elektroforez ortamında ise etrafa daha çok dağılmış bir yapıda olduğu;
- Cometlerin kuvvetli alkali ortamda kısa ve daha yoğun boyandığı gözlemlenirken, zayıf alkali ortamlarda ise uzamış halde göründükleri;
- Cometlerin nötral ortamlarda zayıflayıp gevşemiş DNA loplarından oluştuğu gözlemlenirken, alkali ortamlarda ise DNA' da meydana gelen serbest kırık fragmentlerden oluştuğu gözlemlenmiştir [65].

1.5.1. Tek hücre Jel Elektroforez veya Comet Assay Yöntemi Uygulama Basmakları

Tek hücre jel elektroforez yöntemi olarak bilinen bu yönteme comet assay yöntemi adı da verilmektedir. Tek hücre jel elektroforez yöntemi veya comet assay tekniği, DNA hasarlarını tespit etmek için kullanılan kolay, hassas, güvenilir ve hızlı bir yöntemdir. Comet assay yönteminde temel prensip, kimyasal ve fiziksel nedenlerle meydana gelen genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücrelerde meydana getirdiği etkiyi hücrelerin DNA' larının tek tek incelenmesi ve tespit edilmesi esasına dayanır. Comet Assay yönteminde canlı dokulardan izole edilen çekirdekteki DNA, ince bir agaroz jel içine gömülerek deterjan ve yüksek konsantrasyonlarındaki tuz solüsyonlarında parçalanırlar. DNA molekülü elektroforez ortamında yürütülür. Sonuçta çeşitli genotoksik ajanların etkisi ile hasarlanan DNA'lar tamir mekanizmaları ile tamir edilemeyerek tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalara neden olmuş ise, kırılan farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda hareket ederler. Kırık, hasar içeren DNA molekülleri süper sarmal yapıdan kurtulur, DNA'nın negatif yüklü kırık uçları elektroforez sırasında anoda yani pozitif yüklü uca doğru göç ederler. Floresans boyalarla boyanan hücreler mikroskopta incelendiklerinde kuyruklu yıldıza (comet) benzer bir görüntü oluştururlar [66,67].

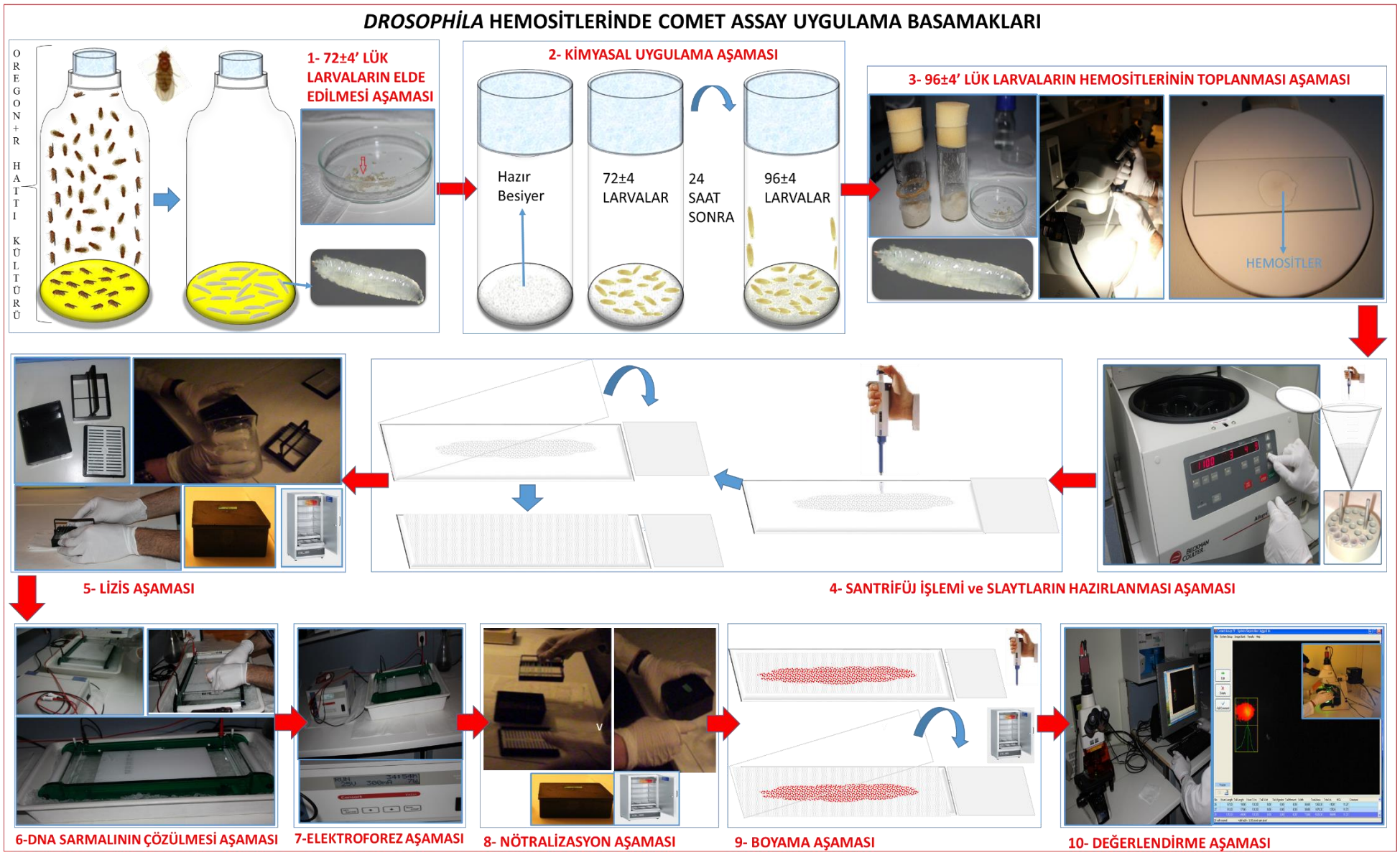
Kuyruk kısmının uzunluğu veya kuyruk kısmındaki DNA yoğunluğu, oluşan DNA hasarının miktarını gösterir. Oluşan kuyruklu yıldız görünümü hem DNA' nın büyüklüğüne hem de DNA' daki kırık sayısına bağlı olarak değişir. DNA ne kadar hasarlıysa kuyruk uzunluğu o kadar artar. Meydana gelen hasar az ise DNA' da göçten çok yayılma görülürken, DNA' da meydana gelen hasar ve kırık sayısı fazla ise DNA parçaları kuyruğa doğru göç eder. Çok hasarlı hücrelerde baş ile kuyruk birbirinden tamamen ayrı görünür [60]. Hasarsız DNA ise bütünlüğünü kaybetmediğinden dairesel bir görüntü oluşturur ve kuyruk benzeri yapı oluşturmaz, hasarın derecesine göre DNA'lar dairesel formdan kuyruklu yıldıza benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturur bu yönteme ingilizce "kuyruklu yıldız" anlamına gelen "Comet Assay" adı da verilir [66].

Comet Assay yönteminde yapılan işlemler laboratuvar koşullarına göre farklılık göstermekle beraber Tice ve ark. (2000) yönteminin genel basamaklarını 8 ana başlık altında toplamışlardır [68].

1. Hücrelerin izolasyonu
2. Slaytların hazırlanması
3. Lizis
4. DNA sarmalının çözülmesi
5. Elektroforez
6. Nötralizasyon
7. Boyama
8. Değerlendirme

Comet assay yönteminin genel İşlem basamakları 8 basamaktan oluşsada hücrelerin izolasyonu, model organizma ve hedef hücrelerin yapısına göre değişmekle beraber ***Drosophila* Hemositlerinde Comet Assay yönteminin** genel uygulama şeması 10 basamaktan oluşmakta olup, aşağıda Şekil 1.13'de sunulmuştur.

Materyal Metod kısmında *Drosophila* Hemositlerinde Comet Assay yönteminin uygulama basamaklarında yapılan işlemler ayrıntılı olarak şematize edilerek ve açıklamalı olarak anlatılmıştır. Ayrıca işlem basamaklarında bahsi geçen *solüsyonlar ve çözeltilerin nasıl hazırlandığı* Materyal Metod kısmında görsel ve sözel olarak detaylı bir şekilde anlatılmıştır.



Şekil 1.13. *Drosophila* Hemositlerinde Comet Assay yönteminin genel uygulama şeması (Orijinal)

1.5.1.1. Hücrelerin izolasyonu

Hücre materyallerinin hazırlanması deneysel çalışmanın amacına bağlı olarak değişkenlik gösterir. Hücre materyali deneysel amaca uygun yapılacak çeşitli modifikasyonların uygulanmasıyla elde edilebilir.

Bu tez çalışmasında DNA tamir mekanizmasına sahip *Drosophila melanogaster'in* Oregon R+ (yabanıl) soyuna ait larvaların hemolinf ve hemositleri hedef hücre olarak kullanılmak üzere Irving ve ark. (2005) [69] yaptığı uygulama şekli temel alınarak yapılmıştır. Hedef hücrelerin *Drosophila melanogaster* larvalarından izole edilmesi ve hücre materyalinin hazırlanması sağlanmış, izole edilen hemositlerde tek sarmal DNA hasarının olup olmadığı Singh ve ark. (1988) [62] tarafından geliştirilen Tek Hücre Jel Elektroforez testi veya Comet Assay testi uygulaması ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

D. melanogaster' in Oregon R+ (yabanıl) soyuna ait larvaların hemositlerinin izole edilmesi Comet Assay uygulama basamağında daha detaylı anlatılmıştır.

1.5.1.2. Slaytların Hazırlanması

İzole edilmiş hücrelerin agaroz jele tutunmasını sağlamak amacıyla deney yapılmadan bir gün önce düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jel mikroskop lamlarına baştan sona yayılarak ön kaplama yapılır ve deney yapılacağı güne kadar bekletilir. Deney yapılacağı gün izole edilmiş olan hücreler düşük erime sıcaklığına sahip agaroz jel içinde süspanse edilir. Süspanse edilen karışım bir gün öncesinden ön kaplama yapılan lamların üzerine yayılır. Böylece iki jel tabakası arasında gömülü hücreleri içeren sandviç benzeri bir yapı oluşturulur [70].

Sağlıklı sonuçlar elde edilmesinde agaroz jelin bozulmadan kalması, konsantrasyonu ve jel içindeki hücrelerin konsantrasyonları çok önemlidir. Optimal hücre sayısı her gözlem alanında birkaç taneden fazla olmamalıdır. Yüksek hücre yoğunlukları özellikle DNA göçünün hızlı olduğu preparatlarda cometlerin üst üste gelmesine neden olur. Yüksek agaroz konsantrasyonu ise DNA göç hızını ve diğer işlem basamaklarını etkiler [70].

1.5.1.3. Lizis

Agaroz jel donduktan sonra yüksek konsantrasyonda tuz ve deterjan içeren lizis çözeltisinde bir saat süreyle bekletilir. Lizis işlemi sırasında çekirdek zarı eriyerek membranlar parçalanır ve hücre içeriği çekirdekten uzaklaştırılarak agaroz içerisinde serbest kalır. DNA küçük bir miktar nonhiston proteinlerle birlikte yüksek süperkoil yapısında kalır [70].

Lizis işleminde serbestleşen DNA ışığa karşı duyarlıdır. Bu basamaktan sonra DNA da ilave kırıklar oluşturmaması için işlemler yarı karanlık odada yapılmalıdır [71].

1.5.1.4. DNA sarmalının çözülmesi

DNA çift sarmal yapısının zincirlerinin birbirinden ayrılmasını sağlamak amacıyla hazırlanan preparatlar elektroforez işleminden önce yüksek alkali özellikteki +4 ^{0}C deki (pH>13) elektroforez tamponunda inkübasyona bırakılır. Elektroforez tanpon çözeltisi içerisinde çekirdekteki çift sarmal DNA süperkoil yapısı, zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılmaya başlar [72].

1.5.1.5. Elektroforez

Preparatların elektroforez çözeltisi içerisinde alkali ortamda bekletilerek DNA süperkoil yapısının açılmasından sonra jel içinde oluşan tek zincir DNA, alkali koşullarda elektroforeze tabi tutulur, oluşan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıkları çekirdekten ayrılarak anoda doğru hareket etmesi amaçlanır, anoda doğru hareket eden DNA parçaları hasarın miktarına göre çeşitli derecelerde kuyruklu yıldız görüntüsü oluşturur. Hasarsız DNA ise çekirdekten çıkamaz ve kuyruk benzeri bir yapı oluşturmaz [60,67,73].

1.5.1.6. Nötralizasyon

DNA moleküllerinin elektroforez basamağında de yürütülmesinden sonra fazla tuz ve deterjanın ortamdan uzaklaştırması amacıyla preparatlar nötralizasyon tamponuyla tekrarlı olarak belli sürelerde yıkanır [60,67,73].

1.5.1.7. Boyama

Bu aşamada bağlayıcı boyalar (akridin oranj, propidum iyodur etidyum bromür, YOYO-1, DAPI, Hoechst- 3258, Hoechst-33342) kullanılarak cometlerin işaretlenerek mikroskopta floresan renk oluşturması amaçlanır [60,67,73].

Boyama işlemi yapıldıktan kısa bir süre sonra renk verme özelliklerini kaybedeceği için preparat 4 saat içerisinde incelenmelidir [60,67,73].

Bununla birlikte, Gichner ve ark. (2006) ethidium bromidin etkinliğinin yukarıda bahsedilen boyalardan farklı olmadığını rapor ettiklerinden [74] uygulamamızda EtBr kullanılmıştır.

1.5.1.8. Değerlendirilme

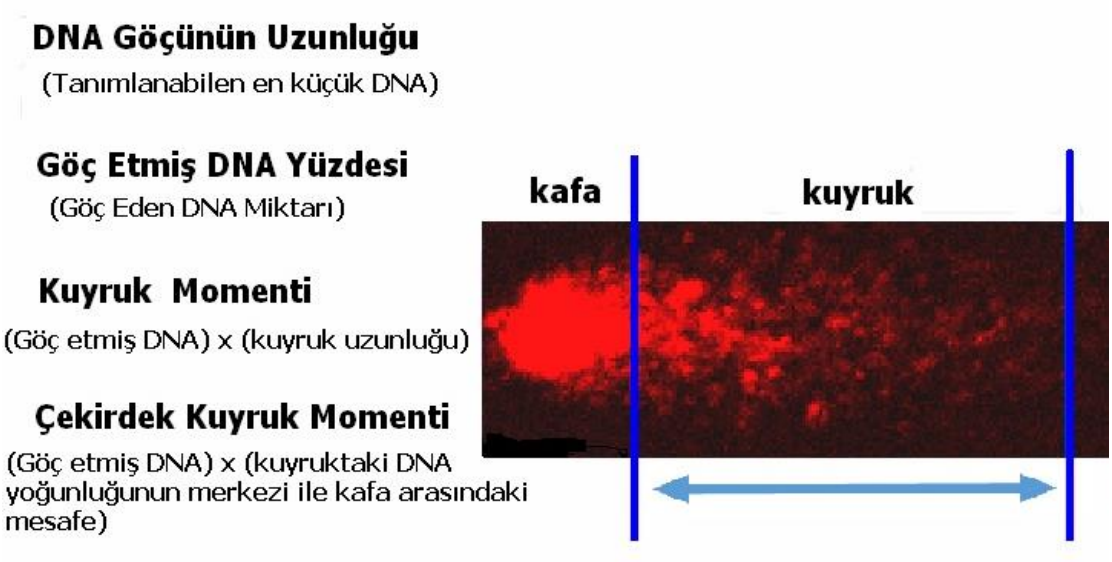
Comet assay test sistemi ile DNA hasarının ve zincir kırıklarının tespit edilmesinde lamlarda bulunan hücrelerin değerlendirilmesinde kullanılan farklı teknikler mevcuttur. DNA hasarı oluşmuş hücre; kafa ve kuyruk diye isimlendirilen iki ana kısımdan oluşmaktadır. Kafa bölgesi çekirdek dışına göç etmeyen kısım olup, kuyruk ise çekirdek dışına göç etmiş kısmı belirtir.

Elektroforez aşamasında yüklü partiküller elektrik akımının etkisiyle net yük, molekül ağırlığı ve elektroforetik ortamın viskozitesine göre birbirinden ayrılarak belli bir mesafe kateder [75].

İşte hücrenin baş ve kuyruk kısmının elektrik akımının etkisiyle (net yük, molekül ağırlığı ve elektroforetik ortamın viskozitesine göre) birbirinden ayrılarak belli bir mesafe katetmesi, akabindede hücrelerin EtBr ile boyandıktan sonra mikroskop altında incelenmesi esnasında bu mesafelerin karşılaştırılmasıyla DNA hasarı ve DNA sarmal kırıklarının değerlendirilmesi hakkında bilgi edinilir.

Hasarsız hücrelerde çekirdek parlak, floresanın şiddeti baş tarafta yoğun bir şekilde görünürken, hasarlı DNA'da kırıklar söz konusu olduğundan floresan görüntü çekirdekten anoda doğru yayılarak kuyrukta yoğun bir şekilde gözlenir. Comet tekniği, hasarlı hücrelerde floresanın baş taraftan kuyruğa geçişini yansıttığından DNA hasarının

kantitatif olarak tayin edilmesinde kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu baz alınır. Sonuçların değerlendirilmesinde görüntü analiz sistemi kullanılması durumunda, göç etmiş hücrelerin kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametrelerine göre değerlendirme yapılır [73].

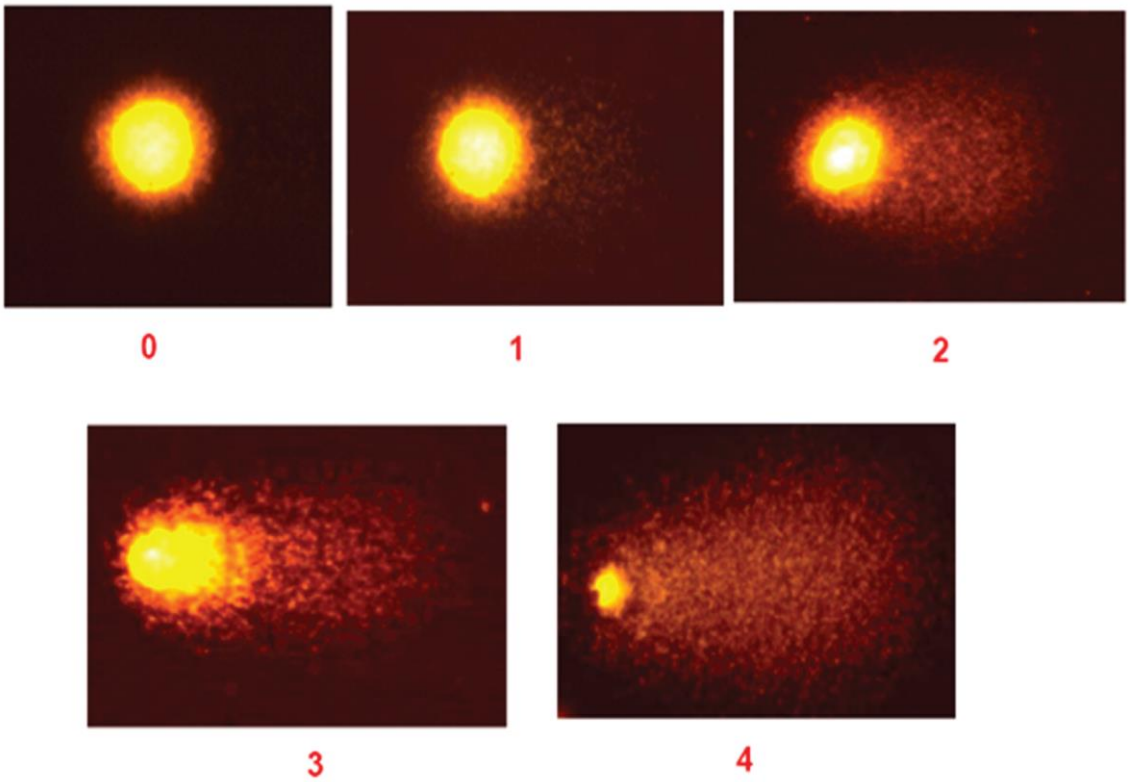


Şekil 1.14. Görüntü analiz sisteminde verilerin hesaplanması [76]

1990 yılından itibaren kuyruk momentinin hesabı kafa hücresinin merkezinden kuyruğun kütlesel merkezine uzaklığının kuyruktaki DNA fraksiyonunu ile çarpımına dayanmaktadır (Şekil 1.13.). Kısacası kuyruk momenti hesaplanırken sadece kuyruktaki DNA miktarı değil göç ettiği mesafe de dikkate alınmaktadır [76].

Görüntü analiz sistemleri bulunmayan laboratuvarlarda hasarlar görsel olarak derecelendirilmektedir. Gözle yapılan değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak kuyruktaki yoğunluğa göre derecelendirilir. Bazı çalışmalarda hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak ayrılabildiği gibi bu sınıflandırma daha sonraki çalışmalarda genişletilerek Şekil 1.14 de görüldüğü gibi hasarsız, az hasarlı, hasarlı, çok hasarlı, tümüyle hasarlı (apoptozis) olmak üzere 5 kategoriye ayrılmıştır [77,78,79].

Lamların kenar kısımlarında kalan DNA' ların daha yüksek oranda hasarlı olduğu belirlendiğinden 'Comet' sayımı aşamasında bu bölümlerde yer alan DNA'lar dikkate alınmamalı, sayım orta kısımlarda yapılmalıdır [71].



Şekil 1.15. Hücrelerin hasar durumlarına göre sınıflandırılmaları (0) hasarsız, (1) az hasarlı, (2) hasarlı, (3) çok hasarlı, (4) tümüyle hasarlı (apoptozis) hücre [71]

1.5.2. Yöntemin Avantajları ve Dezavantajları

Comet Assay yöntemi; kolay, hızlı, hassas, ucuz, güvenilir olması ve hücrelerde meydana gelen DNA hasarlarının/ zincir kırıklarını tespit edilmesine imkan sağlaması, hasarın mikroskobik incelemeler sonucu tespit edilebilir olması nedeniyle genotoksisite uygulamalarında tercih edilen bir yöntem olmuştur.

Genotoksisite üzerine olan çalısmalarda çogunlukla alkali Comet Assay teknigi kullanılmaktadır. Yapılan arastırmalarda birçok toksik ajanın (metal, pestisit, nitrozamin, uyusturucular ve antineoplastic ilaçlar vb.), toksisitesi insan, hayvan ve bitki hücresi kullanılarak in vitro ve/veya in vivo koşullarda Comet Assay metodu kullanılarak araştırılmıştır [80].

Kan vb. ile yapılan çalısmalarda çogunlukla lökositler, lenfositler kullanılırken, bu çalışmada *Drosophila melanogaster* larvalarından izole edilen Hemolinf ve hemositler kullanılmış, sonuçta comet assay test sisteminde uygulamada yapılacak çeşitli modifikasyonlarla hedef alınan hücredeki DNA hasarının tespitine yönelik olarak farklı hücreler kullanılabilmektedir.

Comet yönteminin bir diğer avantajı da çok az miktarda hücre örneğine ihtiyaç duyulması ve sonuçların bir gün de tespit edilmesine imkan sağlamasıdır [73,81].

Comet Assay test sistemi ilk olarak hayvan ve insan hücreleri (kan ve sperm hücreleri) üzerinde uygulanmasına rağmen son yıllarda uygulamada yapılan bazı değişikliklerle birlikte bitkiler ve funguslar üzerinde de uygulama denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir [82,83,84].

Comet assay yönteminin avantajlarının yanında dezavantajları da vardır, tekniğin uygulama basamaklarındaki agaroz jel konsantrasyonu, uygulanan hücre miktarı, elektroforez süresi, cometlerin sayımının aynı kişi tarafından yapılmaması vb. farklılıklar istatistiksel olarak farklı sonuçların bulunmasına neden olur [85].

1.5.3. Yöntemin Uygulandığı Alanlar

Comet assay tekniği, ökoryatik bütün hücrelere uygulanabilen genotoksik ajanların oluşturduğu DNA hasarının tespitinde, çeşitli mutajenik ve karsinojenik ajanların (Örn. sigara, alkol, tütün vs. gibi) populasyon düzeyinde DNA hasarının araştırılarak tespit edilmesinde, DNA hasarının nedeninin araştırılmasında, insan lenfositlerindeki oksidatif stres ile ilgili konuların araştırılmasında, DNA'da direkt olarak sarmal kırıkları oluşturan iyonizasyon radyasyonu ve hidrojen peroksit gibi ajanların oluşturduğu lezyonların ve bu lezyonların tamiri çalışmalarında, memeli hücrelerinde çeşitli ajanlar tarafından oluşturulan DNA hasarı ve tamirlerinin tespitinde, in-vitro ve in-vivo çalışmalarında, genetik toksikoloji araştırmalarında en çok tercih edilen test sistemlerinden birisidir. Hatta Comet assay tekniği ile, bilinen genotoksik ve mutajenik ajanların spesifik aktivitelerinin tespit edilebildiği gibi genotoksisitesi bilinmeyen kimyasalların da spesifik aktivitelerinin tespit edilmesi de mümkündür [73,79,88,89,90,91,92,93].

BÖLÜM 2

KAYNAK ARAŞTIRMASI

Yapılan literatür taramasında, çalışmamızda kullanılan birden fazla fonksiyonu bulunan gıda katkı maddeleri sınıfında yer alan ferrolaktat ile ilgili yapılmış fazla sayıda çalışma olmadığı anlaşılmış olup; uygulamada kullandığımız SMART testi, Comet assay testi ve çeşitli katkı maddeleri ile yapılan çalışmalara ilişkin sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

Türel (2013) [94] gıda katkı maddesi ferrolaktat' ın *Drosophila melanogaster*'in yaşam döngüsündeki larva, pupa ve ergin sayıları üzerindeki etkileri hakkındaki yaptığı çalışmasında; gıda katkı maddesi ferrolaktat' lı besiyer ile beslenen *Drosophila* sineklerinin belli konsantrasyondan sonra larva, pupa ve erginlerin gelişimini negatif yönde etkilediği ve ölümlere neden olduğu, ferrolaktat' ın 0.010' luk konsantrasyonundan büyük derişimlerini içeren besiyerlerle beslenen flr^3 genotipli sineklerde tamamen olmasa da yabanıl tiplerde kesin letal doz olarak saptandığı, yabanıl tip *Drosophila* sineklerinin ferrolaktat' a karşı flr^3 genotipli sineklerden daha hassas olduğu, kontrolsüz aşırı dozdaki ferrolaktat' ın hücrelere zarar verdiği *Drosophila*' da ölümlere yol açtığı belirtilmiştir.

Demir (2011) [95] *Drosophila melanogaster*' de yaptığı SMART çalışmasında bitkisel sıvı yağların kızartma ve kaynatma ürünlerinin *Drosophila melanogaster'* de genotoksik etkiye neden olduğu, sağlık açısından çeşitli sorunlar doğurabileceğini saptanmıştır.

Turna (2012) [96] *Drosophila melanogaster*' de yaptığı SMART çalışmasında, gıdalar ile alınan restravatrölün farklı mekanizmalar ile genotoksik hasara neden olan kimyasalların genotoksisine karşı koruyucu etkisinin olduğunu saptamıştır.

Aşkın ve Uysal (2010) [97] tarafından *Drosophila melanogaster*' de yaptıkları SMART çalışmasında akuatik çevre kirleticisi olan bitkisel östrojen glisitein ve koumestrolün genotoksik etki oluşturmadığını belirtmişlerdir.

Amaral ve ark. (2005) [98] tarafından *Drosophila melanogaster*'de yaptıkları SMART çalışmasında yüzey sularının genotoksik etkiye ve mitotik rekombinasyona neden olduğunu belirtmişlerdir.

Demir ve ark. (2013) [99] tarafından *Drosophila melanogaster* hemositlerinde *(Oregon R+)* yaptıkları Comet Assay uygulamasında; memelilerdeki kan hücreleri ile benzerlik gösteren *Drosophila melanogaster* larvalarının hemolenf ve hemositleri hedef alınarak benzil türevlerinin in vivo alkali comet yöntemiyle genotoksik etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmış, benzil alkol, benzil asetat, benzaldehit ve aroma maddeleri olarak kullanılan benzoik asitin farklı konsantrasyonlarının (5, 10, 25 ve 50 mM) genotoksik etkisinin test edilmesi amacıyla *Drosophila melanogaster* larvalarının hemolenfleri ve hemositleri toplanarak santrifüj işlemi ile izole edilerek comet assay yöntemi ile DNA hasarı istatistiksel olarak tespit edilmiş, *Drosophila* hemositleri ile yapılan uygulamalarda comet assay metodolojisi istatistiksel analizine göre anlamlı gözlenen ve doza bağlı olarak artış gösteren DNA hasarı oluşumu tespit edilmiş, uygulamada kullanılan benzil türevinin yüksek konsantrasyonlarının büyük ölçüde DNA hasarlarına neden olduğu, benzil türevlerinin genotoksik riskinin tespit edildiği ve *Drosophila* hemositlerinde comet yönteminin benzer çalışmalarda kullanılabileceği ve faydalı bir test sistemi olduğu değerlendirilmiştir.

Carmona ve ark. (2011a) [100] tarafından *Drosophila melanogaster* hemositlerinde *(Oregon R+)* yaptıkları comet assay çalışmasında, *Drosophila melanogaster* larvalarında bulunan hemositleri kullanarak mutajen etkisi bilinen 3 maddenin İn vivo bir test sistemi olan comet assay yöntemiyle genotoksik etkileri teste tabi tutulmuş, çalışmada memelilerdeki kan ile benzerlik gösteren ve kolaylıkla elde edilen *Drosophila* larva hemositleri izole edilerek mutajenlere maruz bırakılarak istatistik analizler yapılmış, üç tanınmış mutajenik madde Etil Metan Sülfonat (EMS), potasyum dikromat (PD) ve gama radyasyonuna 3. İnstar dönemindeki *Drosophila* larvaları maruz bırakılmış, EMS (1, 2 ve 4 mM), Pd konsantrasyonları (0.5, 1 ve 2.5 mM) ve gama radyasyon (2, 4, 8 ve Gg) farklı dozlarına maruz bırakılan larvaların hemolenf ve hemositleri ekstrakte edildikten sonra santrifüj işlemi ile izole edilerek comet assay yöntemi ile yapılan istatistiksel analizde, uygulama grubundaki mutajen maddelerin doza bağlı olarak artış gösteren DNA hasarına neden olduğu ve hemositlerin açıkça duyarlı birer hücre olduğunun kanıtlandığını, bu sonuçların *Drosophila* hemositlerinde comet

yönteminin in vivo deneylerde kullanılabilecek, yararlı bir yöntem olduğu değerlendirilmiştir.

Carmona ve ark. (2011b) [101] tarafından *Drosophila melanogasterde SMART testi ve Drosophila* hemositlerinde *(Oregon R+)* yaptıkları comet assay uygulamasında, mutajenik aktivitesi üzerindeki etkileri bilinen iki nikel bileşiği olan nikel klorid ($NiCl_2$) ve nikel sülfatın ($NiSO_4$) genotoksik etkisi: heterezigotluğun kaybedilmesi ve mutajenik etkilerin imajinal disk hücrelerinde değişim göstererek kanat fenotiplerinde kendisini mutant klon (küçük tekli klon, büyük tekli klon ve ikiz klon) oluşturmasıyla gösteren SMART testi prensibi ve DNA zincir kırıklarının tespit edilmesine yarayan in vivo bir test sistemi olan *Drosophila* hemositlerindeki hücrelerin hedef alındığı comet assay yöntemi ile araştırılmıştır. SMART testi sonucunda, $NiSO_4$ ün doz artışına bağlı olarak DNA hasarında artışa neden olduğu, İlaveten, gama- radyasyon ve $NiCl_2$, $NiSO_4$ ile kombine tedavileri karşılaştırıldığında mutant klonların (küçük tekli klon, büyük tekli klon ve ikiz klon) azda olsa artış göstererek istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildiği; *Drosophila* hemositlerinin hedef alındığı comet assay yönteminin istatistiksel analizinde ise $NiSO_4$ bileşiğinin artan dozlarda DNA hasarında artışa neden olduğu ve anlamlı sonuçlar elde edildiği, *Drosophila melanogaster* hemositlerinin $NiSO_4$ tarafından uyarıldığını ve DNA hasarlarının tespit edilmesinde etkili bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Carmona ve ark. (2011c) [102] tarafından *Drosophila melanogasterde SMART testi ve Drosophila* hemositlerinde *(Oregon R+)* yaptıkları comet assay uygulamasında, iki inorganik kurşun bileşiğinin [$PbCI_2$ ve $Pb(NO_3)_2$] genotoksik etkisi test edilmiş, comet assay yönteminde hedef hücre olarak *Drosophila* larvalarından izole edilen hemositlerin kullanıldığı, $PbCI_2$ ve $Pb(NO_3)_2$ kimyasallarının kanat benek testi sonuçlarındaki mutant klonlarlarda sürekli bir artışa neden olmadığı, DNA hasarını indirgeyebileceği öngörüsüyle çalışılan önemli bir çeşitlilik göstermediği, İlaveten gama radyasyonu ve test edilen kurşun kaynaklı $PbCI_2$ ya da $Pb(NO_3)_2$ bileşiklerinin yapılan istatistiksel analizlerde önemli bir farklılık göstermeyerek iyonize radyasyon vasıtasıyla DNA hasarının tamir edilmesine yönelik etkileşime girmediği, *Drosophila* hemositlerinde yapılan comet assay yöntemi sonucunun istatistiksel olarak değerlendirilmesinde de $Pb(NO_3)_2$ artan dozlarında DNA hasarında belirgin artışlara neden olduğu, Kurşun bileşiğin genotoksik risk oluşturabileceği sonucuna varılmıştır.

Siddique ve ark. (2005) [103] tarafından *Drosophila melanogaster* hemositlerinde *(Oregon R+)* yaptıkları comet assay uygulamasında, mutajenik ve karsinojenik alkaliler olan Etil Metan Sülfonat (EMS), methil metansulfonat (MMS), N- ethil N-nitrozüre (ENU) ve siklofosfomidin (CP) etkisi araştırılmış, uygulanan tüm dozlarda artışa bağlı olarak DNA hasarının meydana geldiği ve methil metansulfonat kimyasalı (MMS) hariç diğer kimyasalların düşük konsantrasyonlarda DNA hasarına neden olmadığı tespit edilmiş, methil metansulfonat kimyasalının (MMS) güçlü, N- ethil N-nitrozüre (ENU) kimyasalının düşük genotoksik etkisi olduğunu sonucuna varılmıştır.

Mukhopathyay ve ark. (2004) [104] tarafından *Drosophila melanogaster*' de COMET testi kullanarak cypermethrinin genotoksik etkisini araştırdıkları çalışmalarında, Cypermethrinin artan dozlarına bağlı olarak beyin ganglia ve anterior midgut hücrelerinde DNA hasarında artış olduğunu sonucuna varılmıştır.

Carvalho ve ark. (2011) [105] tarafından comet testi ile yapılan çalışmada, gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılan katkı maddelerden biri olan ve doğal antioksidan olarak kabul edilen sodyum metabisülfitin kan, karaciğer ve kemik iliği hücrelerinde DNA hasarını önemli derecede indüklediği sonucuna varılmıştır.

KOMET testi kullanılarak yapılan birçok çalışmada çeşitli besin antioksidanlarının farklı fiziksel ve kimyasal mutajen ve karsinojene karşı koruyucu etki gösterebileceği yapılan çalışmalarda ifade edilmektedir [106, 107, 108, 109, 110, 111].

Tozan Beceren ve ark. (2011) [112] tarafından yapılan çalışmada, kolorektal kanser hastaları ve birinci derece yakın akrabalarında periferal kan lenfositlerinde Comet tekniği ile DNA hasarı belirlenmiş olup, çalışma sonucunda yeni teşhis konmuş kolorektal kanser hastaları ve birinci derece akrabaları ile kontrol grubunda anlamlı farklılık bulmuşlardır.

Sarıkaya ve ark. (2010) [113] tarafından *Drosophila melanogaster* (mwh x flr) çaprazında patent blue, karminik asit, indigokarmin, eritrosin ve amaranth gibi beş farklı gıda boyasının çaprazlanan bireylerin yaşama yüzdeleri araştırılmış, boya maddelerinin konsantrasyonu arttıkça, çaprazlanan bireylerin yaşama yüzdelerinin kontrol grubuna göre önemli ölçüde düştüğünü, konsantrasyon arttıkça, gıda boyalarının toksik etkisinin arttığı sonucuna varılmıştır.

Özdemir ve arkadaşları (2012) [114] tarafından insan lenfosit hücre kültürlerinde mikronukleus (MN) tekniği ile koruyucu gıda katkı maddelerinden potasyum sorbat, sodyum benzoat, sodyum nitritin genotoksisitesi araştırılmış, sadece sodyum nitritin genotoksik etki gösterdiğini sonucuna varılmıştır.

Kaya B. ve Yanıkoğlu A. (1999) [115] tarafından yapılan çalışmada, iki çeşit herbisit olan 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) ve 4-Klorofenoksiasetik asit (4-CPA) nın *Drosophila melanogaster'* de farklı konsantrasyonlarda ve farklı F1, F2, F3 kuşaklarında pupa olma süresi, pupa evresi ve ergin birey çıkış hızında farklılaşmalar olduğu sonucuna varılmıştır.

BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOD

Bu çalışmada gıda katkı maddesi olan ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml) üç farklı konsantrasyonun *Drosophila* İnstant medium/hazır besiyerlere emdirilerek;

72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvaların hazırlanmış olan ferrolaktat' lı besiyerlere maruz bırakılması ve imajinal disk hücrelerinde meydana gelen değişikliklerin ergine gelişen bireylerin kanat fenotiplerinde mutant klon oluşturması sonucunda meydana gelen genotoksik etkilerin, Graf ve ark. (1984) [52] tarafından geliştirilen Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) ile tespit edilmesi ve;

*Drosophila melanogaster'*in DNA tamir mekanizmasına sahip Oregon R+ (yabanıl) soyuna ait 72±4 saatlik larvalarının 24 saat süreyle ferrolaktat' lı besiyerlere maruz bırakılması ve 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin, Irving ve ark. (2005) [69] yaptığı uygulama şekli temel alınarak izole edilmesi, izole edilen hemositlerde de DNA hasarının olup olmadığının Singh ve ark. (1988) [62] tarafından geliştirilen Tek Hücre Jel Elektroforez testi veya Comet Assay testi uygulamalarının yapılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında yapılan iki ayrı teknik olan SMART test sistemi uygulaması ve Comet Assay test sistemine ilişkin uygulama basamakları materyal metod kısmında iki ayrı basamakta ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Deney koşulları 25 ^{0}C sıcaklık ve % 60 bağıl nemde 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda yapılmıştır.

Laboratuarımızda stok kültürler standart *Drosophila* besiyerinde yaşatılmaktadır. Çalışmada kullanılan standart besiyer içeriği ve standart besiyerinde kullanılan asit karışımının içeriği Tablo 3.1. ve Tablo 3.2. de gösterilmiştir [39].

Tablo 3.1. *Drosophila* standart besiyerinin içeriği [39]

Kullanılan Madde	**Miktar**
Mısır unu	104 gr
Toz şeker	94 gr
Bira mayası	19 gr
Agar agar	6 gr
Distile su	1020 ml
Asit karışımı	6 ml

Tablo 3.2. *Drosophila* standart besiyerinde kullanılan asit karışımının içeriği [39]

ASİT KARIŞIMI	**Kullanılan Madde**	**Miktar (ml)**
	Ortophosphorik asit	83
	Propiyonik asit	836
	Distile Su	1081

3.1. Standart Besiyer Hazırlanması

Stardart Drosoplila Besiyeri Lewis besin hazırlanması yönteminde küçük modifikasyonlarla hazırlanmıştır. Besiyer hazırlanırken, 510 ml distile su bir kaba aktarılır. İçerisine 19 g bira mayası yavaş yavaş eklenir ve distile su içerisinde homojen bir şekilde karışması sağlanır, üzerine 104 g mısır unu yavaş yavaş eklenerek karıştırılır, ardından 94 g şeker yavaş yavaş eklenerek karıştırılır. Ayrı bir kaba 510 ml distile su aktarılır üzerine 6 g agar topaklanmaya mahal verilmeyecek şekilde yavaş yavaş eklenerek karıştırılır. Ardından iki kaptaki karışım bir kaba alınarak karıştırılır ve karışım kısık ateşte 5-10 dakika kadar karıştırılarak pişirilir, karışım bir iki dakika kadar kaynadıktan sonra ocaktan indirilir. Bu esnada karışımın üzerine 6 ml fungus oluşumunu engelleyici etkisi bulunan asit karışımı ilave edilir ve karıştırılır. Asit karışımı eklenmeyen besiyerlerde Şekil 3.1.dekine benzer fungus oluşumu gözlenir.



Şekil 3.1. Asit karışımı eklenmemiş standart besiyerde fungus oluşumu (Orijinal)

Hazırlanan besiyer hala sıcaklığını korurken daha önceden steril edilmiş 250 ml' lik besiyer şişelerine 1,5 veya 2 cm olacak şekilde aktarma yapılır. Standart besiyer şişelerine aktarma yapılmadan önce sterilize edilmesi şarttır, aksi halde laboratuvar ortamında bulunabilecek mikroorganizmaların kültür ortamında çoğalarak *Drosophila melanogaster*' in yumurta, larva, pupa ve hatta ergin bireylerine zarar verebildikleri, deney sonucunu etkileyebildikleri tespit edilmiştir.

Sterilize edilmemiş besiyer ortamında ve uygun laboratuvar koşullarının oluşturulmadığı çalışmalardaki kültür ortamlarında Şekil 3.2. dekine benzer mayt yada akar adı verilen eklem bacaklı canlıların çoğaldıkları gözlemlenmiştir.



Şekil 3.2. Steril olmayan kültür ortamında bulunan mayt (akar) görünümü (Orijinal)

Graf ve ark. (1984) [52] yapmış oldukları araştırmalarda, kültüre alınan *Drosophila* ergin bireylerinin kuru besin üzerine yumurta bıraktıklarını tespit ettiklerinden, standart besiyer şişelerinin ağzı kurutma kağıdı ile kapatılarak besiyerin kuruması ve soğuması sağlanır. Standart besiyer kuruduktan sonra besiyer şişesinin ağzı steril hidrofor bez / pamuk veya sünger tıkaç ile kapatılır.

Yapılan uygulamada yalnızca Larva toplama aşamasında *Drosophila* instant medium / hazır besiyer kullanılmış olup, diğer aşamalarda taze (1, 2 günlük) standart besiyer kullanılmıştır.

SMART uygulamasında ergin bireylerin kanatları vücutlarından ayrılırken ve preparat hazırlama aşamasında Tablo 3.3. de içeriği belirtilen faure solüsyonu kullanılmıştır. Kanatların gövdeden ayrılması esnasında kanatlara ve üzerindeki kıllara zarar verilmemesine özen gösterilmiştir.

3.2. Kanat SMART Testi Uygulamasında Kullanılan Çözelti ve Kimyasallar

Tablo 3.3. Faure çözeltisinin içeriği [115]

Kullanılan Madde	**Miktar**
Gum arabic (Arap Zamkı)	30 g
Gliserol	20 ml
Kloral hidrat	50 g
Distile su	50 ml

Tablo 3.4. *Drosophila melanogaster* Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi'inde Kullanılan Kimyasallar

Numara	**Kimyasal Adı**	**Kullanım Gerekçesi**
1	Agar (Agar-agar)	*Drosophila* kültürlerinin çoğaltılması için besiyer hazırlanması aşamasında kullanılır.
2	Propionik asit	*Drosophila* kültürlerinin çoğaltılması için besin hazırlanmasında mikrobiyal kontaminasyonu engellemek amacıyla kullanılır.
3	Gum arabic (Arap zamkı)	*Drosophila* kanat preparatlarını daimi hale getirmek için kullanılan faure solüsyonunun hazırlanmasında kullanılır.
4	Kloral hidrat	
5	Gliserol	
6	Eter	Kimyasal uygulanmasından sonra ergin hale gelen *Drosophila* bireylerinin toplaması gerektiği aşamada erginleri bayıltmak için kullanılır.

3.3. Comet Assay Testi Uygulamasında Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3.5. Comet assay veya Tek Hücre Jel Elektroforezi Testi'nde Kullanılan Kimyasallar ve hangi aşamalarda kullanıldıkları

No	Kimyasal Adı	Kullanıldığı yerler ve Kullanılma alanları
1.	PBS - Phosphate Buffered Saline	Hücrelerin arındırılması, seyreltme yapılması ve hemositlerin ayrılması aşamasında kullanılır.
2.	LMA - Low Melting Agar (Düşük Erime Isılı)	DNA kırıklarının incelenmesi amacıyla hazırlanan preparatların kaplanmasında ve hücrelerin tutunmasında kullanılır.
3.	NMA – Normal Melting Agar (Normal Erime Isılı)	DNA kırıklarının incelenmesi amacıyla hazırlanan preparatların kaplanmasında ve hücrelerin tutunmasında kullanılmaktadır.
4.	NaCl - Sodyum klorid	DNA' nın negatif yükünün nötrolize olmasına yardımcı olur ayrıca hücre duvarından geçerek proteinleri hücre duvarından ayırır. Lysis solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmaktadır.
5.	Triton X-100	Lipidler arasındaki bağları bozarak hücre içeriğinin DNA nın izole olmasına yardımcı olur. Lysing solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmaktadır.
6.	N-lauroylsarcosine sodium salt solution	Zar proteinlerinin saflaştırılmasında ve transkripsiyon verimliliğin azaltılmasında kullanılır. Lysing solüsyonunun hazırlanmasında kullanılmaktadır.
7.	Trizma Baz	Lysis solüsyonu hazırlanmasında ve Nötralizasyon tamponunun hazırlanmasında kullanılır.
8.	EDTA - Disodium Salt Dihydrate	DNA polimeraz enzimi DNA zincirini uzatmak için magnezyuma ihtiyaç duyar. EDTA magnezyumu bağlayarak DNaz aktivitesini inhibe eder ve DNA zincirlerinin uzamasını önler. Lysis solüsyonu ve elektroforez tamponunun hazırlanmasında kullanılmaktadır.
9.	HCl - Hidroklorik Asit	Elektroforez tamponunun hazırlanmasında kullanılmaktadır.
10.	NaOH - Sodyum hidroksit	Elektroforez tamponunun hazırlanmasında kullanılmaktadır.
11.	EtBr - Etidyum bromid	Agaroz jel içerisindeki DNA arasındaki bağlara tutunarak floresans mikroskop altında DNA' ların görünür hale getirilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

3.3.1. Comet Assay veya Tek Hücre Jel Elektroforezi Testinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

3.3.1.1. Elektroforez Solüsyonu Hazırlanması



Şekil 3.3. Elektroforez solüsyonu hazırlanmasının gösterilmesi (Orjinal)

1- 24 g NaOH ve 0.74 g EDTA tartılarak büyük bir behere alınır.

2- Üzerine 2 litreden 15- 20 ml kalacak şekilde distile su eklenir.

3- Beher içindeki çözelti 10 dakika karıştırıcıda magnet yardımı ile karıştırılır.

4- pH metrenin ucu distile su ile yıkanıp peçete ile kurutulduktan sonra, pH metre yardımıyla karışımın pH' nın 13.2 olması için HCl ile damlatılır. (Karışım karıştırıcıda magnet yardımıyla karıştırılırken bu esnada, karışıma damla damla HCl damlatılır, bu işlem pH ın birden yükselip birden alçalmasından kaynaklı yavaş yavaş yapılmalıdır.)

5- Üzerine 15-20 ml distile su eklenir.

6- Hazırlanan solüsyon 2 lt' lik bir kaba aktarılır ve kullanılacağı zamana dek + 4 ^{0}C de buzdolabında saklanır.

3.3.1.2. Nötralizasyon Solüsyonu Hazırlanması

Konsantrasyon	Kimyasal	Molekül Ağırlığı	600 ml
0.4 M	Trizma baz	121,14 g/mol	29.1 g
pH HCl ile 7.5 e ayarlanır.			





Şekil 3.4. Nötralizasyon solüsyonu hazırlanmasının gösterilmesi (Orjinal)

1- 29.1 g Tizma baz tartılarak büyük bir behere alınır.

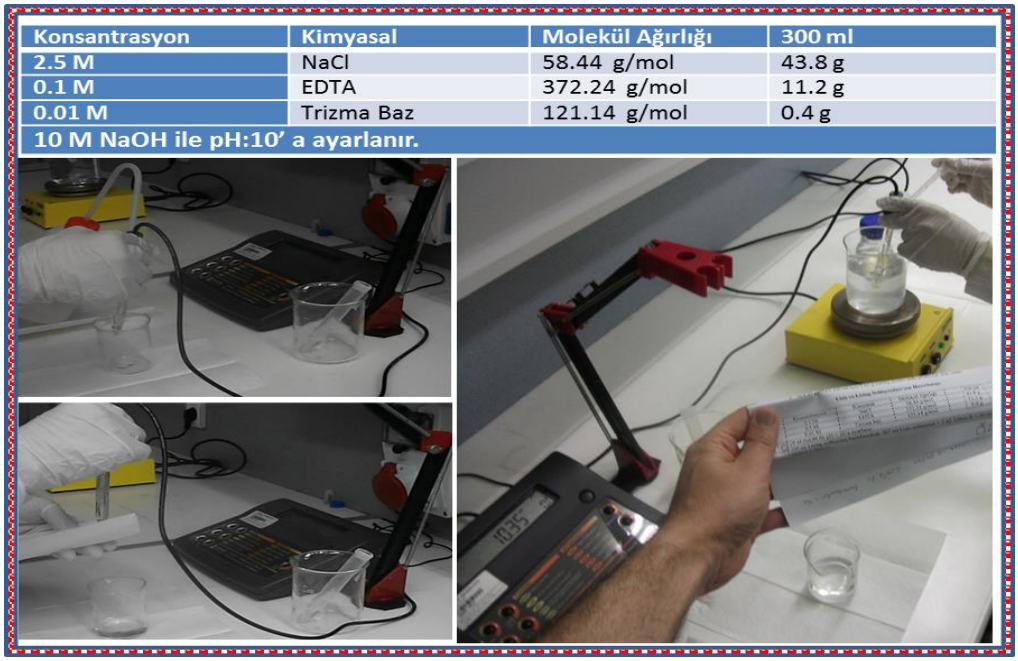
2- Üzerine 600 ml distile su eklenir.

3- 5 dakika karıştırıcıda magnet yardımıyla ile karıştırılır.

4- pH metrenin ucu distile su ile yıkanıp peçete ile kurutulduktan sonra, pH metre yardımıyla karışımın pH' nın 7.5 olması için damla damla HCl damlatılır. (Karışım karıştırıcıda magnet yardımıyla karıştırılırken bu esnada, karışıma damla damla HCl damlatılır, bu işlem pH ın birden yükselip birden alçalmasından kaynaklı yavaş yavaş yapılmalıdır.)

5- Solüsyon 600 ml'lik bir kaba aktarılır ve kullanılacağı zamana dek + 4 ^{0}C de buzdolabında saklanır.

3.3.1.3. Lysis Solüsyonu Hazırlanması



Konsantrasyon	Kimyasal	Molekül Ağırlığı	300 ml
2.5 M	NaCl	58.44 g/mol	43.8 g
0.1 M	EDTA	372.24 g/mol	11.2 g
0.01 M	Trizma Baz	121.14 g/mol	0.4 g
10 M NaOH ile pH:10' a ayarlanır.			

Şekil 3.5. Lysis solüsyonu hazırlanmasının gösterilmesi (Orjinal)

1- 43.8 g NaCl, 0.4 g Trizma baz ve 11.2 g EDTA tartımı yapılarak üzerine 300 ml distile su ile karıştırılır.

2- 15 dakika karıştırıcıda magnet yardımı ile ile karıştırılır. Karışım daha sonra 5 dk hem ısıtılır hem karışıma devam edilir.

3- pH metrenin ucu distile su ile yıkanıp peçete ile kurutulduktan sonra, pH metre yardımıyla karışımın pH' nın 10 olması için damla damla NaOH damlatılır. (Karışım karıştırıcıda magnet yardımıyla karıştırılırken bu esnada, karışıma NaOH eklenir, bu işlem pH ın birden yükselip birden alçalmasından kaynaklı yavaş yavaş yapılmalıdır.)

4- Hazırlanan solüsyon 300 ml' lik bir kaba aktarılır ve kullanılacağı zamana dek + 4 ^{0}C de buzdolabında saklanır.

3.3.1.4. Lysis Solüsyonundan ***Lysing Solüsyonu*** Hazırlanması

+ 4 ^{0}C de buzdolabında bekletilen lysis solüsyonu deneyin yapılacağı gün çıkarılır ve;

1- 300 ml lysis solüsyonundan 6 ml si çıkarılır ve atılır.

2- Yerine 3 ml N- Larin Sarcosine Sodium Salt ve 3 ml Triton-X eklenir ve pipetaj yapılır.

3- Karışım 5-10 dakika karıştırıcıda magnet yardımıyla ile karıştırılır.

4- Solüsyon şalelere koymak üzere en az 1 saat +4 ^{0}C de buzdolabında bekletilir.

Lysis solüsyonundan lysing solusyonu hazırlanırken *Drosophila* hemositlerinin dokularının düşük konsantrasyonlu dokularında sitotoksik etkisi olduğu tespit edilen Dimetil Sülfoksit (DMSO) yerine N- Larin Sarcosine Sodium Salt kullanılmıştır [100].

3.3.1.5. LMA- Low Melting Agarozun Hazırlanması



Şekil 3.6. LMA- Low Melting Agarozun hazırlanmasının gösterilmesi (Orjinal)

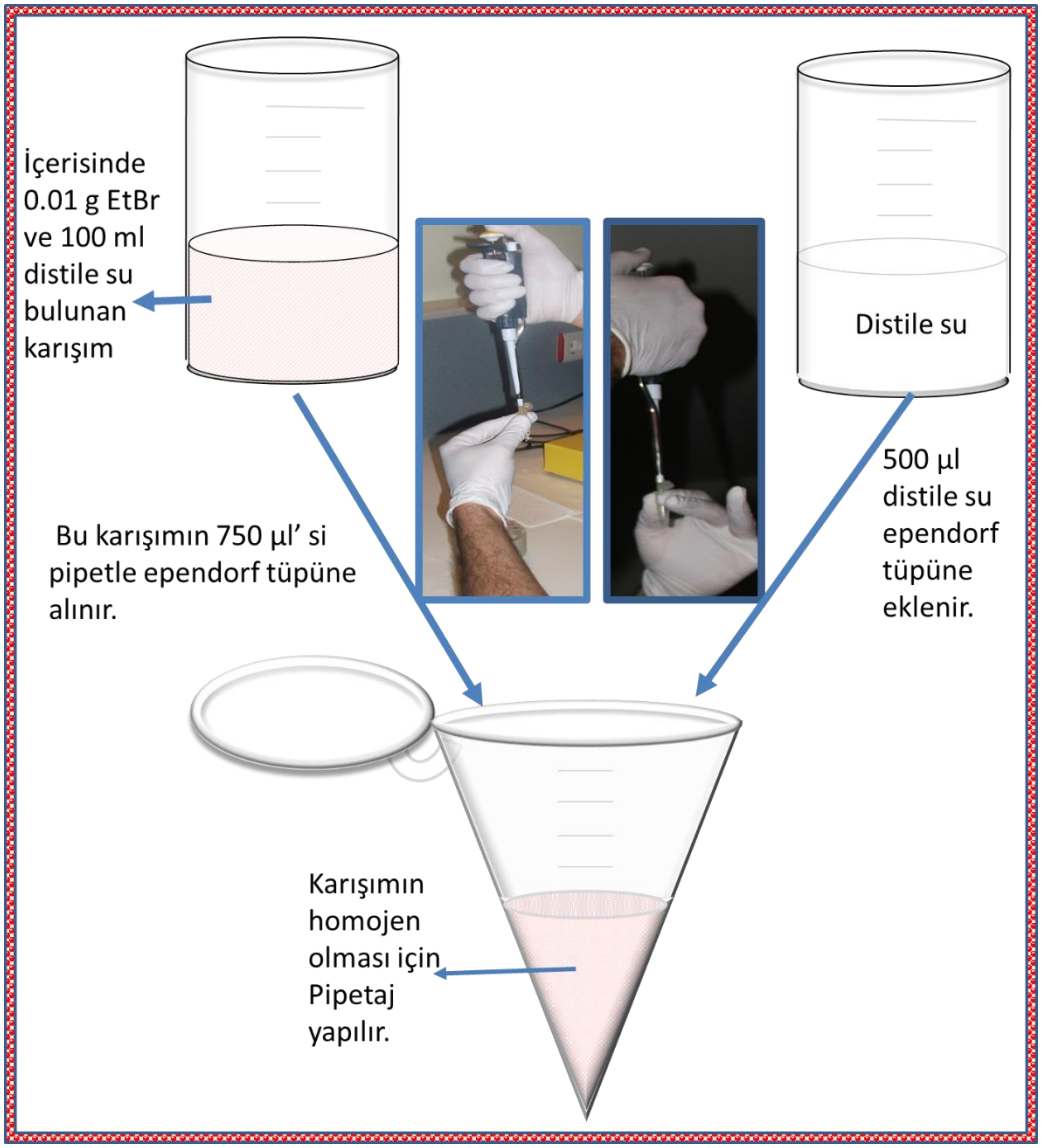
1- *Drosophila* comet uygulaması için 0.075 g LMA ve 10 ml PBS bir behere alınır. Miktarlar az olduğu için buharlaşmanın önüne geçmek maksadıyla beherin ağzı parafin streç ile kapatılır.
2- Karışım 5 dakika kadar karıştırıcıda magnet yardımıyla karıştırılır.
3- Ardından karıştırıcıdan alınan karışım kaynayıncaya (ilk taşma anına kadar) microdalga fırına alınır ve kaynadığı görüldüğü anda mikrodalga fırından çıkarılır.
4- Çıkarılan karışım birkaç dakika soğumaya bırakılır ardından kullanıma hazır hale gelir.

3.3.1.6. NMA- Normal Melting Agaroz Solüsyonu ve NMA Kaplı Lamların Hazırlanması



Şekil 3.7. NMA- Normal Melting Agaroz solüsyonu ve NMA kaplı lamların hazırlanmasının gösterilmesi (Orjinal)

3.3.1.7. Etidyum Bromürlü Karışım Hazırlanması



Şekil 3.8. Etidyum Bromürlü karışımın hazırlanmasının gösterilmesi (Orjinal)

1- 0.01 g Etidyum Bromür ve 100 ml distile su behere alınır, dikkatlice pipetaj yapılır.

2- Magnetik karıştırıcıda birkaç dakika karışım yapılması sağlanır. (EtBr zararlı bir kimyasal olduğundan doku ile kimyasal temas olmamasına dikkat edilmelidir.)

3- Bu karışımdan 750 µl alınarak ependorf tüpüne koyulur, ardından 500 µl distile su ilave edilir ve pipetaj yapılır.

4- Uygulama sırasında ependorf tüpünde hazırlanan bu karışımdan her preparata 60 µl alınarak ayrı ayrı preparatlara soldan sağa yayılır ve 24x60 mm' lik lamel ile kapatılır.

3.4. *Drosophila melanogaster*' de SMART Testinin Uygulanması Aşaması

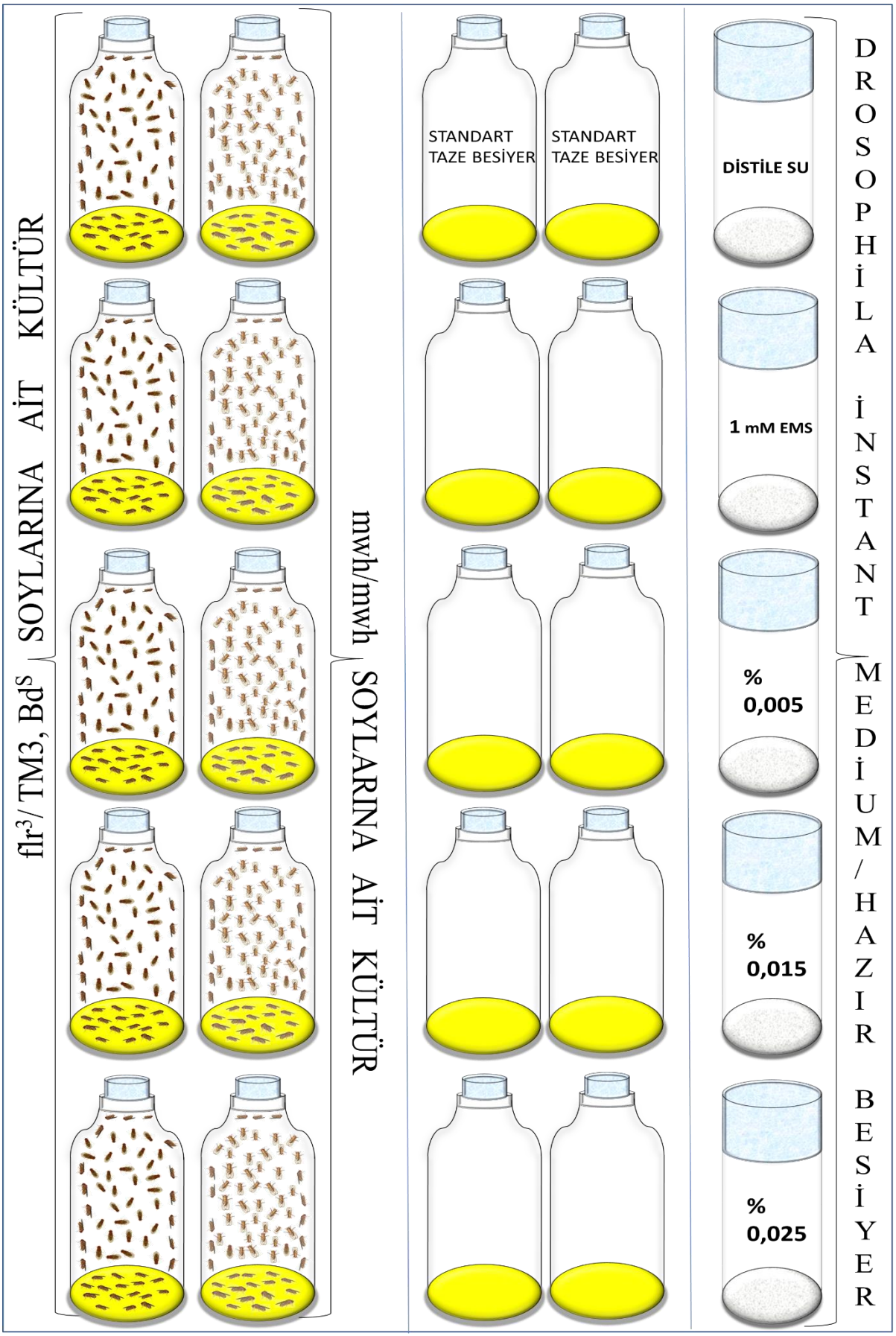
Çalışmanın bu kısmında kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) kullanılmıştır. Uygulama basamakları Graf vd. [46,47,48,50,52] yapmış oldukları çalışmalar esas alınarak yapılmış olup, uygulama basamaklarında Kaya vd. [115] çeşitli modifikasyonları uygulanarak çalışma tamamlanmıştır.

Uygulamada 40 adet mwh/mwh erkek birey ile ve 40 adet flr^3/TM3, Bd^S genetik yapılı dişi virgin bireylerin çaprazlanması ile elde edilen 3. İnstar dönemindeki transheterezigot larvalar kullanılılmıştır. flr^3/TM3, Bd^S hattının yüksek yumurta verimine sahip olması nedeniyle çaprazlamada dişi bireyleri tercih edilmiştir. Deney koşulları 25^0C sıcaklık ve % 60 bağıl nemde 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda yapılmıştır. ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml) konsantrasyonlarında ve pozitif kontrol grubu olarak kullanılan 1mM EMS kimyasalı ve negatif kontrol grubu olarak kullanılan distile su hazır besiyer / İnstant mediumlara eklenerek/emdirilerek 3. İnstar dönemindeki 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvaların bu besiyerlerde beslenerek ergin hale geldikten sonra kanatlarında oluşan mitotik mutasyonların tespit edilmesi sağlanmıştır.

3.4.1. Deney Düzeneği ve Uygulama Aşamaları

Kanat SMART test sisteminde yapılacak uygulamalar 7 ana basamaktan oluşmaktadır. Uygulamada ferrolaktat' ın % 0.005 g/ml, % 0.015 g/ml, % 0.025 g/ml konsantrasyonları, 1mM EMS ve distile su olmak üzere 5 ayrı düzenek hazırlanmış olmasına rağmen, şekillerde yalnızca bir uygulama grubuna ait şematize yapılmıştır (Şekil 3.9.).

Ayrıca bu tez çalışmasında, *Drosophila melanogaster* Kanat SMART testi uygulamasına ilişkin tüm basamaklar yazılı olarak antıldıktan hemen sonra, anlatıma yardımcı olmak maksadıyla görsel fotoğrafların yer aldığı şekillere yer verilmiştir.



Şekil 3.9. *Drosophila melanogaster*' de kanat SMART testi uygulamasına ait deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi (Orijinal)

3.4.2. Kanat SMART Testi Uygulama Basamakları

3.4.2.1. Çaprazlama Yapılması İçin Birey Toplanması Aşaması

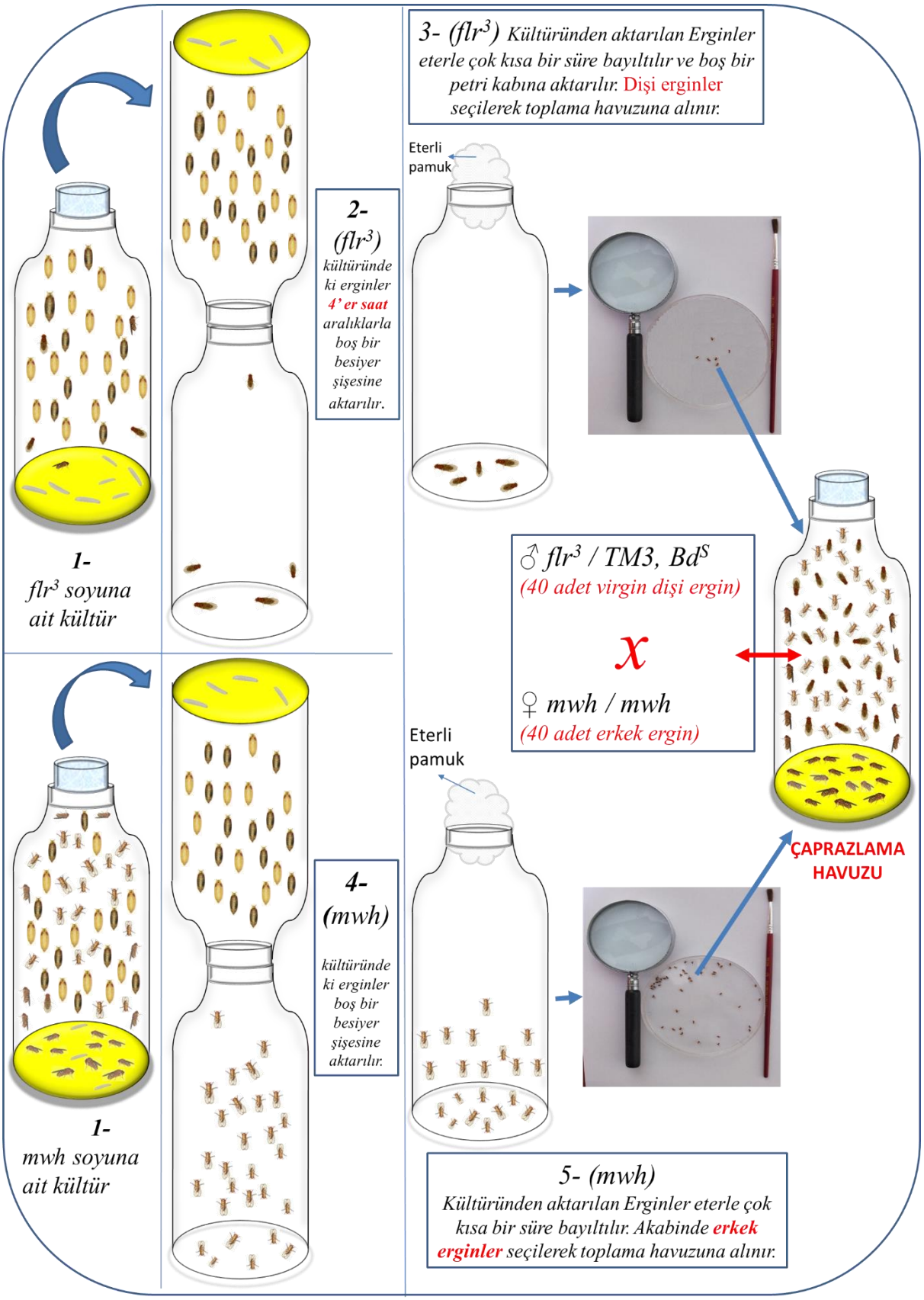
1- SMART uygulamasında 3. dönem transheterezigot larva elde edilebilmesi amacıyla *Drosophila melanogaster*' in flare (flr^3) ve multiple wing hair (mwh) mutant soylarının bulunduğu kültür ortamından ergin bireylerin toplanması sağlandı. Bunun için,

2- *Drosophila melanogaster*' in flare (flr^3) soyuna ait kültür ortamında bulunan ergin bireyler 4' er saat aralıklarla toplandı. Bunun nedeni *Drosophila melanogaster* erkek ergin bireylerinin pupadan çıktıktan hemen sonra eşeysel olgunluğa erişmeleri ve dişi ergin bireylerin ise pupadan çıktıktan 5-6 saat sonra eşeysel olgunluğa erişmelerindendir. Kültürde bulunan flare (flr^3) soyuna ait dişi ergin bireyler döllenmeden önce yani 4' er saat aralıklarla kontrol edilerek her 4 saatte bir pupadan çıkan erginler başka bir besiyer şişesine aktarıldı. Besiyer şişesinin ağzı çok kısa bir süre eterli pamuk ile kapatılarak erginler bayıltıldı.

3- Eterle bayıltılan flr^3 soyuna ait ergin bireyler boş bir petri kabına aktarılarak dişi erginler seçildi ve çaprazlama havuzuna aktarıldı. Bu işlem bir uygulama grubu için flr^3 soyundan 40 adet dişi virgin erginin çaprazlama havuzuna aktarılmasına kadar devam eder.

4- Çaprazlamada multiple wing hair (mwh) soyuna ait kültür ortamında bulunan erkek ergin bireyler kullanıldığından, çeşitli aralıklarla kültür ortamında bulunan ergin bireyler boş bir besiyer şişesine aktarılarak, şişenin ağzı çok kısa bir süre eterli pamuk ile kapatıldı.

5- Eterle bayıltılan mwh soyuna ait ergin bireyler boş bir petri kabına aktarılarak erkek ergin bireyler seçildi ve Çaprazlama havuzuna aktarıldı. Bu işlem bir uygulama grubu için mwh soyundan 40 adet erkek ergini çaprazlama havuzuna aktarana kadar devam eder.



Şekil 3.10. Kanat SMART testi uygulamasında Çaprazlama yapılması için birey toplanması aşamasının şematik olarak gösterilmesi (Orijinal)

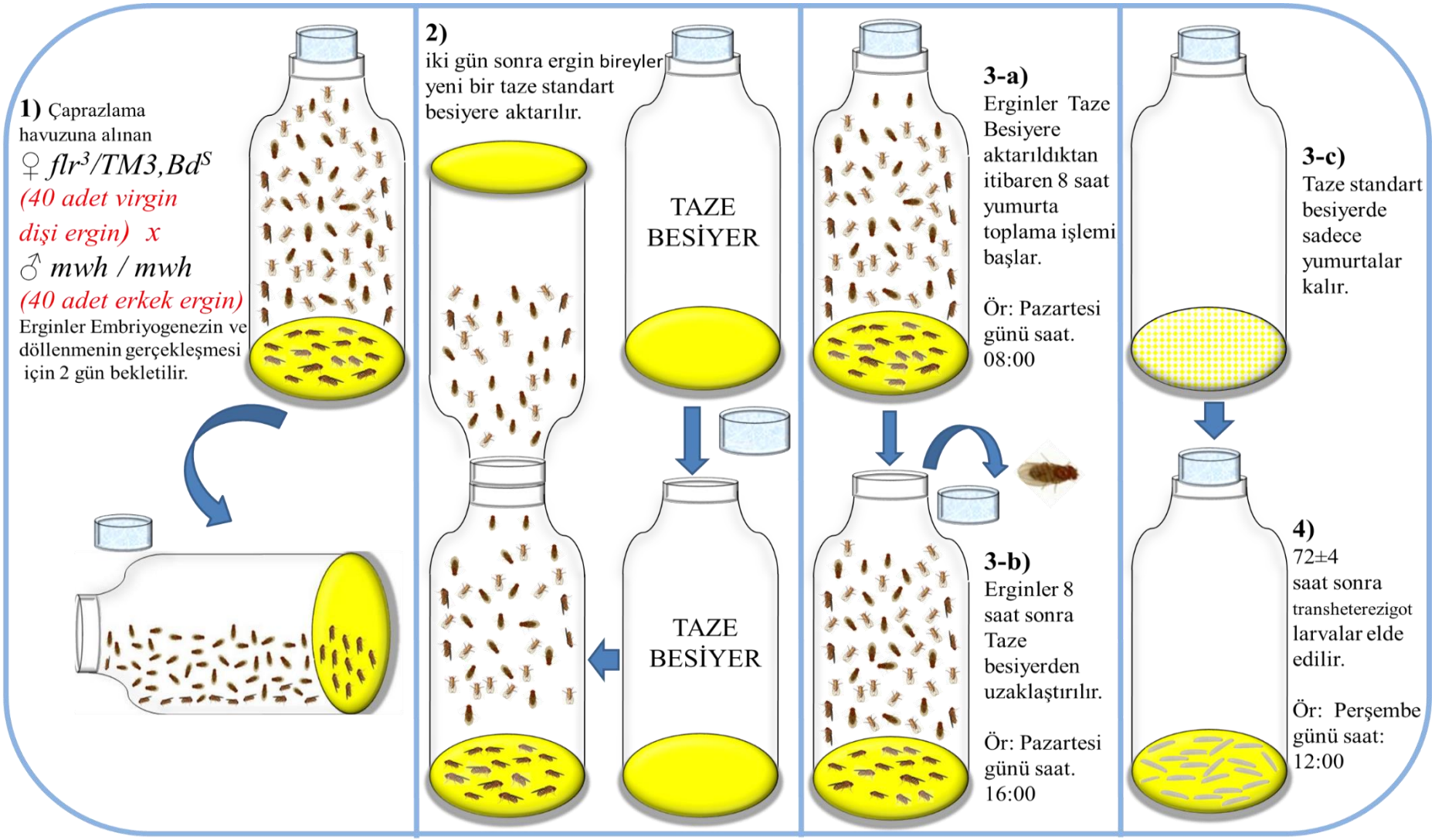
3.4.2.2. Yumurta Toplanması ve 72±4 saatlik Transheterezigot Larvaların Elde Edilmesi Aşaması

1- 40 adet $flr^3/TM3,Bd^S$ soyundan dişi virgin ergin birey ile 40 adet mwh / mwh soyundan erkek ergin birey döllenme ve embriyogenezin gerçekleşmesi amacıyla 2 gün süreyle 25 ^OC de % 60 bağıl nem de ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık kültür ortamında bekletildi.

2- İki gün sonra ergin bireyler yeni taze standart besiyere aktarıldı.

3- Taze besiyere aktarılan ergin bireylerin 8 saat süre ile 25 ^OC de % 60 bağıl nemdeki kültür ortamında besiyere yumurta bırakmaları sağlandı. 8 saat sonra erginler besiyer ortamından uzaklaştırıldı.

4- 72±4 saat sonra erginlerin uzaklaştırıldığı besiyerdeki yumurtalar 25 ^OC de % 60 bağıl nem de ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık kültür ortamında 3. Larva evresine gelir ve 72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 Transheterezigot Larvalar elde edildi.



Şekil 3.11. Kanat SMART testi uygulamasında 72±4 saatlik Transheterezigot larva elde edilmesi aşamasının şematik olarak gösterilmesi (Orijinal)

3.4.2.3. 72±4 Saatlik Transheterezigot Larvaların Toplanarak Ferrolaktat Uygulaması ve Gelişen Erginlerin Toplanması Aşaması

1- 72±4 saatlik transheterezigot larvaların bulunduğu besiyer şişelerinin ağzında bulunan sünger tanponlar çıkarıldı ve besiyere bir miktar musluk suyu/distile su eklendi.

2- Besiyerler tek tek dikkatlice çalkalandı ve larvaların zarar görmemesi amacıyla tülbent bez süzgeçten geçirilerek larvaların süzgeçte toplanması sağlandı. Bu işlem her bir uygulama grubu için besiyer şişesindeki transheterezigot larvalar toplanıncaya kadar devam eder.

3- Deney tüpleri içerisine birer ölçek 4.5 g *Drosophila* instant medium/hazır besiyer eklenir ve üzerine çalışmada kullanacağımız ferrolaktat kimyasalının hazırlanan üç ayrı konsantrasyonu (0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml), pozitif kontrol (EMS) ve negatif kontrol grubu olarak kullanılan distile sudan ayrı ayrı olacak şekilde 9' ar ml deney tüplerinde bulunan *Drosophila* instant medium/hazır besiyerlerin üzerine aktarılır ve besiyerler ıslatılır.

4- Ayrı ayrı ferrolaktat (0.005, 0.015, 025 (g/ml)) , 1 mM EMS ve distile suyun 9 ml' si ile ıslatılan hazır besiyer/*drosophila* instant medium kısa bir süre bekletildi.

5- Islatılan hazır besiyer/*Drosophila* instant medium bulunan deney tüplerine ayrı ayrı ikişer spatül yaklaşık 100' er adet 72±4 saatlik mwh/flr^3 transheterezigot larva eklendi. Ardından deney tüplerinin üzeri tanpon süngerlerle kapatıldı.

6- Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan ferrolaktat, 1 mM EMS ve Distile su ile ıslatılan hazır besiyer/ *Drosophila* İnstant Medium bulunan deney tüplerindeki transheterezigot larvalar bu besiyerlerle beslenerek/maruz kalarak 25 ^{O}C de % 60 bağıl nem de ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık kültür ortamında gelişerek ergin halini aldı. Ergin bireyler başka bir deney tüpüne aktarılarak eter yardımıyla bayıltıldı.

7- Eterle bayıltılan erginler, inceleneceği zamana kadar bozulmadan saklanabilmesi amacıyla % 70 alkol çözeltisi bulunan tüplere aktarılıp ağzı kapatılarak, +4 ^{0}C de buzdolabında saklandı.



Şekil 3.12. Kanat SMART testi uygulamasında 72±4 saatlik Transheterezigot larvaların toplanarak kimyasal uygulanması aşamasının gösterilmesi (Orijinal)

3.4.2.4. Kanat Preparatlarının Hazırlanması Aşaması

1- +4 ^{0}C de % 70 alkol çözeltisinde bekletilen transheterezigot larvadan Ergine gelişen bireylerin bulunduğu tüpteki alkol çözeltisi pastör pipeti ile alındıktan sonra ergin bireyler kuru ve temiz bir petri kabına aktarıldı. Petri kabındaki ergin bireylerin üzerine distile su eklenerek yıkandı.

2- Bir adet çukur lama damlalık yardımıyla 1 damla faure solüsyonu eklendi. Faure solüslonu eklenen çukur lam stero mikroskobunun altına alındı.

3- Petri kabında bulunan normal kanatlı olan ergin bireyler tek tek ucu sivri pens yardımıyla alınarak faure solüsyonuna batırıldı ve ucu ince bir sabitleyici ile (iğne uçlu kalem vb.) ergin birey faure solüsyonu içerisinde sabitlenirken, ergin bireyin kanatlarının pens yardımıyla kanat bütünlüğüne zarar vermeyecek şekilde tek tek stero mikroskop altında gövdeden ayrılması sağlandı. Kanatlardan birisine zarar verilmesi halinde diğer kanatta istatistiksel olarak hesaba katılmadı.

4- Hangi uygulama grubu ve konsantrasyonda çalışılıyorsa lamın rodajlı kısmına kurşun kalem ile kimyasal ve konsantrasyon yazıldı. (Örneğin: EMS 1mM). Gövdeden ayrılan kanatlar çiftler yan yana gelecek şekilde pens yardımıyla dikkatlice dizildi.

5- Her bir lama 8 çift yatay, 3 dikey sırada toplam 24 çift toplam 48 kanat yan yana gelecek şekilde dizilidi.

6- Üzerinde 24 çift toplam 48 kanat bulunan lam, boş bir petri kabına alınarak petri kabının kapağı kanatlara değmeyecek şekilde kapatıldı ve kuru bir ortamda 2 gün süre ile kuruması için bekletildi.

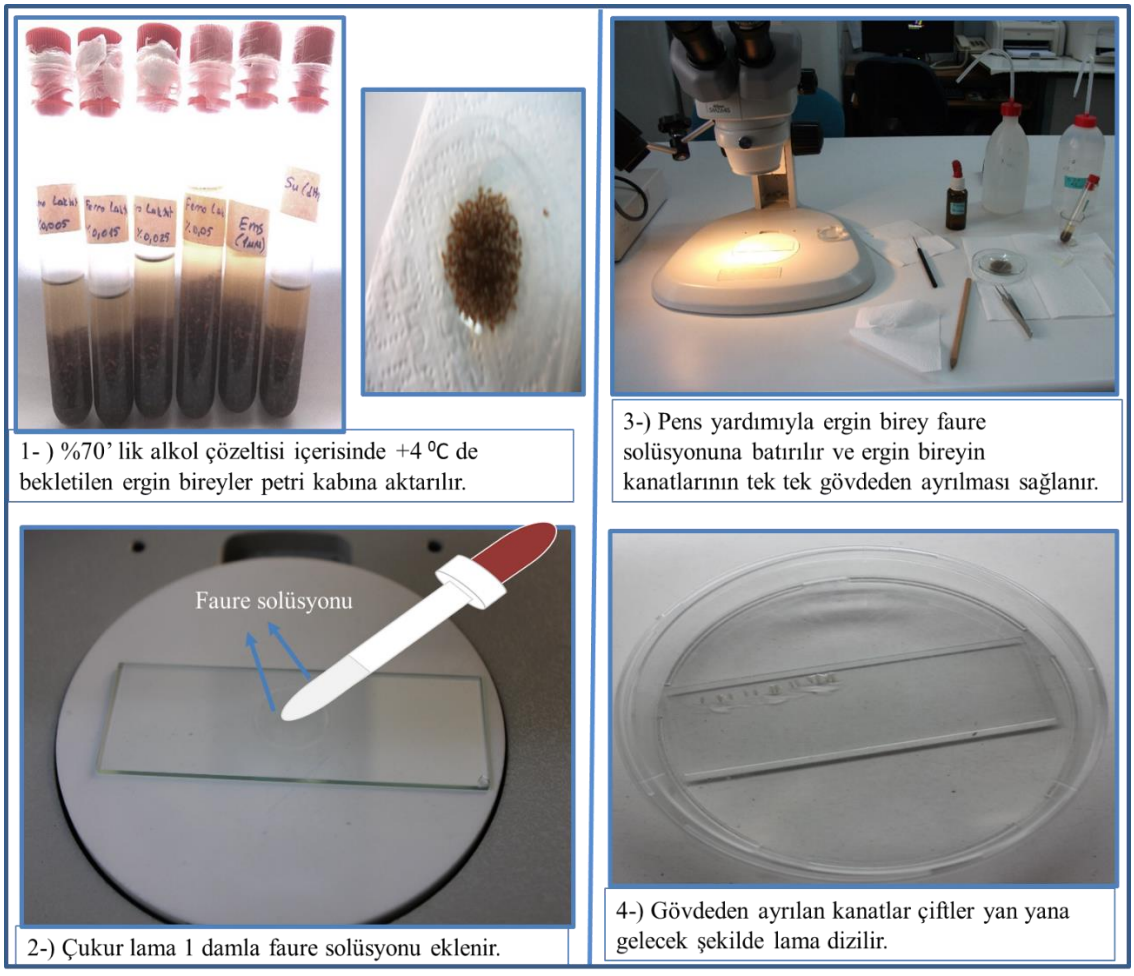
7- 2 gün sonra kuruyan 24 çift toplam 48 kanatın bulunduğu lamlar petri kabından çıkarıldı. Kanatların bulunduğu lamların üzerine damlalık yardımıyla Faure solüsyonu eklendi. Faure solüsyonu eklenirken kanatlara değmeden soldan sağa doğru tek bir çizgi halinde ve hava boşluğu bırakmayacak şekilde damlatıldı.

8- Tek çizgi halinde faure solüsyonu damlatılan lamın üzeri 24x60 mm' lik lamel ile 45 derece açı yapacak şekilde ve hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı.

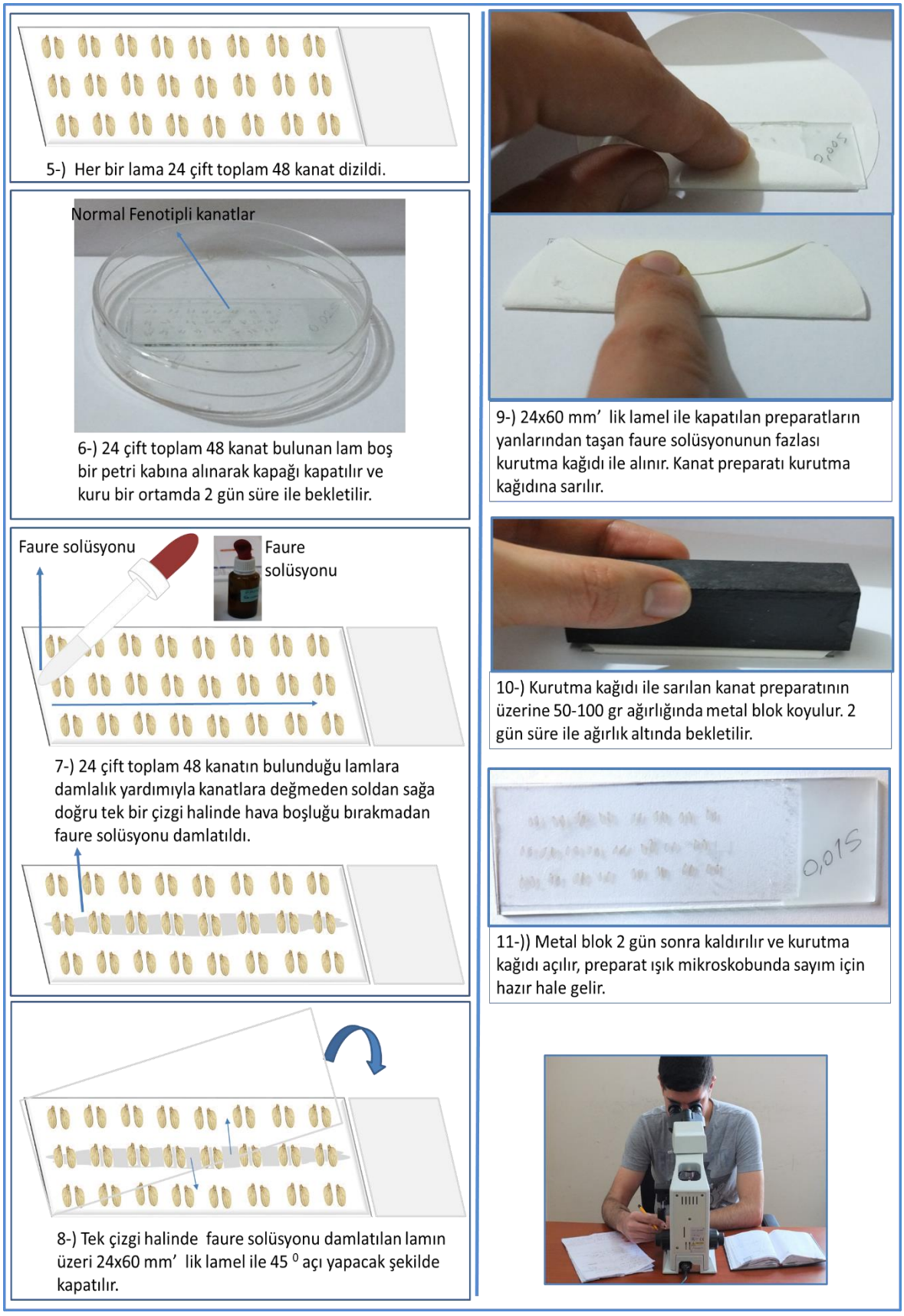
9- 24x60 mm' lik lamel ile kapatılan preparatların yanlarından taşan faüre solüsyonunun fazlası kurutma kağıdı ile alındı ardından Preparat kurutma kağıdı ile dikkatlice sarıldı.

10- Kurutma kağıdı ile sarılan preparatın üzerine ortalama 50-100 gr ağırlığında metal blok koyuldu ve bu şekilde 2 gün süre ile bekletildi.

11- Metal blok altında bekletilen kanat preparatı 2 gün sonra metal levhanın altından kaldırılarak kurutma kağıdı açıldı, kurutma kağıdı açılırken preparat üzerinde kalan kağıt parçaları distile su ile ıslatılan peçete yardımıyla silindi. Preparat mutant klonların sayımı için hazır hale geldi.



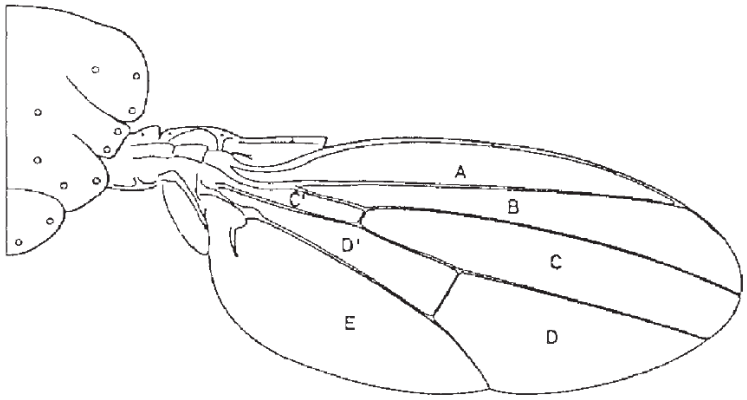
Şekil 3.13.Kanat SMART testinde kanat Preparatlarının Hazırlanmasının gösterilmesi-1(Orijinal)



Şekil 3.14. Kanat Preparatlarının Hazırlanmasının gösterilmesi-2 (Orijinal)

3.4.2.5. Kanat Preparatlarının Mikroskopta Analiz Edilmesi Aşaması

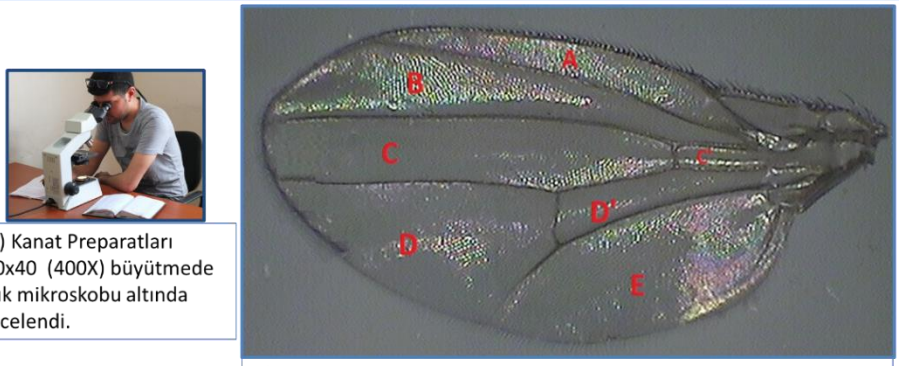
Kanat preparatları ışık mikroskobu ile 10x40 (400X) büyütmede sayılır. Normal Kanatların bulunduğu preparatlar 10X40 büyütmede kanat üzerinde bulunan 7 sektörün her iki yüzü (dorsal ve ventral) de tek tek incelenerek klonların ayrı ayrı kaydeldilmesi sağlanır [115].



Şekil 3.15. Kanat sektörlerinin isimlendirilmesi [56]

Her kanat Şekil 3.15. teki gibi 7 sektöre A, B, C, C', D, D', E ayrılarak [A(mwh klonları, flr^3 klonları) ; B (mwh klonları, flr^3 klonları); C (mwh klonları, flr^3 klonları); C' (mwh klonları, flr^3 klonları); D (mwh klonları, flr^3 klonları); D' (mwh klonları, flr^3 klonları); E (mwh klonları, flr^3 klonları)] ayrı ayrı incelendi. *(Örnek: 1. Kanat için sonuçlar: A (1, 4) , B (0,0), C (3, 16), C' (1,0) D (0,5), E (4,0) bu şekildedir)*

Mutant klonların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Graf ve ark. 1984 yılında [52] yapmış oldukları değerlendirme göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Buna göre; tek tip klon ve ikiz klon halinde sınıflandırma yapılmıştır. mwh hücresine ait 1 veya 2 tane klonlar küçük tek tip klon, mwh hücresine ait 3 veya daha fazla klonlar büyük tek tip klon, flr^3 hücresine ait kalın ve düzgün olmayan kısalmış nokta veya koyu renkli balon şeklinde olan trikomlardan 4 veya daha fazla sayıda klonlar büyük tek tip klon olarak sayıldı. flr^3 4 ten az sayıda olanları için sayım yapılmadı. Ayrıca iki mutant klon arasında 3 veya daha fazla sayıda yabanıl tip trikom olması halinde iki ayrı klon olarak sayıma dahil edilmiştir.



1) Kanat Preparatları 10x40 (400X) büyütmede ışık mikroskobu altında incelendi.

2) Normal Kanatların 7 sektörü ayrı ayrı incelenir ve mutant klonlar örnek tabloya tek tek kaydedilir.

SN	A (MWH, FLR)	B (MWH, FLR)	C (MWH, FLR)	C' (MWH, FLR)	D (MWH, FLR)	D' (MWH, FLR)	E (MWH, FLR)
1	A (1,5)	B (2,0)	C (0,7)	C' (5,0)	D (0,0)	D' (4,29)	E (1,0)
2							

Şekil 3.16. Kanat preparatlarının mikroskopta incelenmesinin gösterilmesi (Orijinal)

3.4.2.6. Klon İndüksiyon Frekansının Hesaplanması Aşaması

Kronik uygulamalarda her hücrede ve her hücre bölünmesindeki ortalama indüksiyon frekansı aşağıdaki formül ile hesaplanmaktadır [55].

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

Genç larvalarda oluşan klonlar sayı bakımından azdır fakat bunlar oldukça büyük klonlardır. Larval gelişim esnasındaki sürekli hücre çoğalması, imajinal disklerdeki hedef hücre sayısının artmasına neden olur. Böylece mutajen uygulanan larvanın yaşının artması ile birlikte klon indüksiyon frekansının artması beklenir. Artan klon sayısının aksine oluşan klonların büyüklükleri genç larvalara göre daha küçüktür. Bu yüzden kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için mutajen uygulanmasında en uygun zamanın 72. saat olduğu bildirilmektedir [116].

Sadece *mwh* klonlar göz önüne alınırsa, denklemdeki "f" *mwh* klonların indüksiyonunun ortalama frekansını, "n" gözlenen toplam *mwh* klon sayısını, "N" analiz edilen kanat sayısını ve "C" bir kanat üzerindeki incelenebilecek hücre sayısını göstermektedir. Daha önceki yapılan çalışmalarla bu sayının 24.400 olduğu belirlenmiştir [117].

3.4.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi Aşaması

Elde edilen veriler, *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış olan bilgisayar programı MICROSTA paket programı yardımıyla hesaplandı. Orijinal (null) hipotez (Ho)'da uygulamalar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak fark olmadığı varsayıldı. Alternatif hipotez (Ha)' da ise uygulama grubundaki indüklenen mutasyon oranının kontrol grubundan *m* defa daha fazla olduğu varsayıldı. Orjinal ve alternatif hipotezler Binomial Şartlı Test kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar kullanılarak pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak gösterildi [118].

Hesaplama sonucunda eğer uygulama grubundaki (n_t) mutant sektör sayısı çizelge değerine eşit veya büyükse H_o red edildi. Aynı şekilde, kontrol grubundaki (n_c) mutant sektör sayısı eğer çizelge değerine eşit veya büyükse H_A red edildi. Orijinal ve alternatif hipotezlerin kabul veya red edilmesinde karar verilirken Kastenbaum ve Bowman (1970) [119] çizelgesinden yararlanıldı (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. Orijinal ve alternatif hipotezlerin değerlendirilmesi [118, 120]

HİPOTEZLER		**H_A**	
		KABUL (1-β)	RED (β)
H_O	KABUL (1-α)	**ÖNEMSİZ FARK** P=(1-α)(1-β)=1-α–β+αβ	**NEGATİF** P=(1-α)β=β–αβ
	RED (α)	**POZİTİF** P=α(1-β)=α–αβ	**ZAYIF POZİTİF** P=αβ

3.5. *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde Comet Assay Yöntemi Olarakta Bilinen Tek Hücre Jel Elektroforez Yönteminin Uygulanması Aşaması

Çalışmanın bu kısmında gıda katkı maddesi olan ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml)' lik olmak üzere üç farklı konsantrasyonu ile pozitif kontrol grubu olarak 4 mM Etil Metan Sülfonat (EMS) kimyasalı ve negatif kontrol grubu olarak distile su kullanılmış olup, kullanılan maddelerin genotoksik etkisinin olup olmadığı comet assay yöntemi olarak da bilinen Tek Hücre Jel Elektroforez yöntemi ile *Drosophila melanogaster'* in hemositlerindeki hücrelerdeki genotoksik etkilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

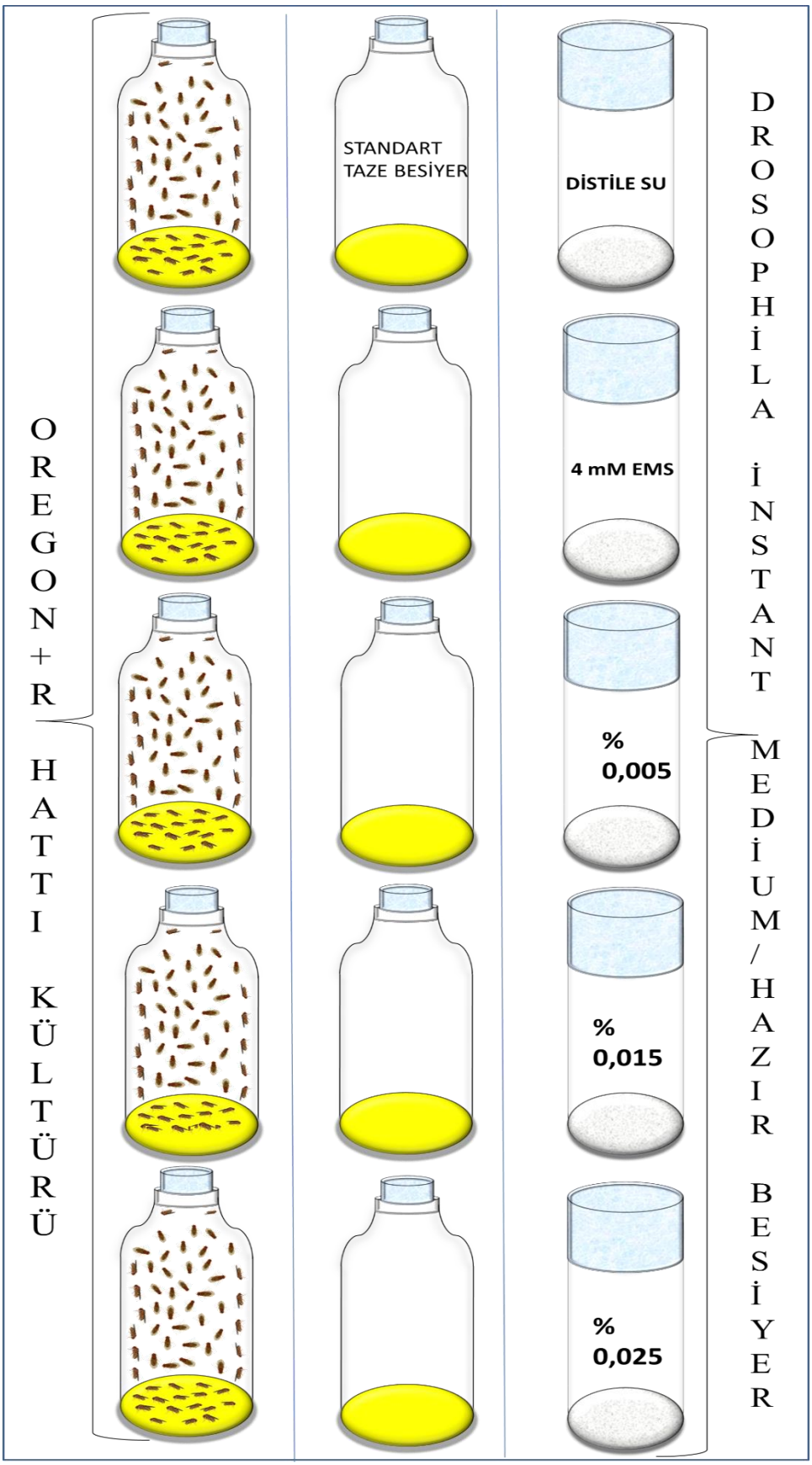
Uygulamada *Drosophila melanogaster*' in DDT' ye dirençli DNA tamir mekanizmasına sahip olan ve diger mutant soylara (*flr3*/*TM3, Bds ve mwh*) kıyasla daha yüksek sitokrom P 450 seviyesine sahip Oregon R+ hattı [38] yabanıl genetik soyundan bireylerin çaprazlanması ile elde edilen 3. İnstar evresindeki (72±4 saatlik) larvalara 24 saatlik kimyasal uygulanarak 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin İrving ve ark (2005) [69] metoduna göre yapılmış, larvalar izole edildikten sonra, Singh (1988) ve ark. [62] Comet assay yöntemi olarak da bilinen Tek Hücre Jel Elektroforez yöntemi prosedürüne göre ve Demir ve Kaya (2013) [99] , Demir (2012) [121], Demir ve ark. (2013a) [122] yaptıkları çalışmalardaki küçük modifikasyonların uygulanarak Larva hemositlerdeki tek zincir DNA hasarının olup olmadığı hususlarının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Deney koşulları 25 ^{0}C sıcaklık ve % 60 bağıl nemde 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamda yapılmış, ayrıca yalnızca kimyasal uygulaması esnasında *Drosophila* instant medium/hazır besiyer kullanılmış olup, bunun haricinde standart taze besiyer kullanılmıştır.

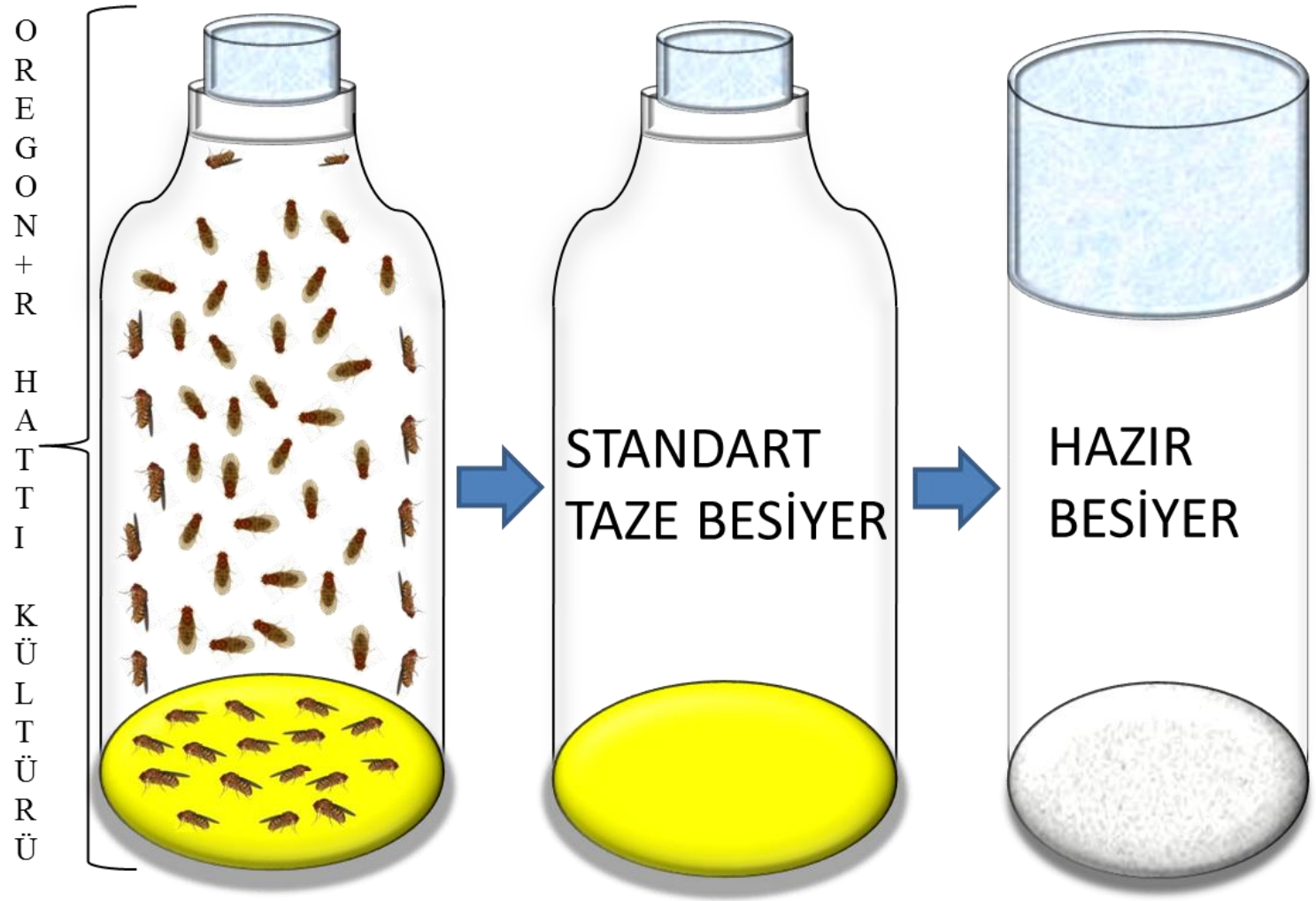
3.5.1. Deney Düzeneği ve Uygulama

Yapılacak uygulamalar 10 ana basamaktan oluşmaktadır. Uygulamada ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml)' lik konsantrasyonları, 4 mM EMS ve distile su olmak üzere 5 ayrı düzenek hazırlanmış olmasına rağmen, şekillerde yalnızca bir uygulama grubuna ait şematize yapılmıştır (Şekil 3.17. ve Şekil 3.18.).

Ayrıca bu tez çalışmasında, *D. melanogaster* Comet Assay uygulamasına ilişkin tüm basamaklar yazılı olarak antıldıktan hemen sonra, anlatıma yardımcı olmak maksadıyla görsel fotoğrafların yer aldığı şekillere yer verilmiştir.



Şekil 3.17 *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulaması deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi (Orijinal)



Şekil 3.18. *Drosophila* Comet assay yöntemi uygulamasında tek bir derişime ait deney düzeneğinin şematik olarak gösterilmesi (Orijinal)

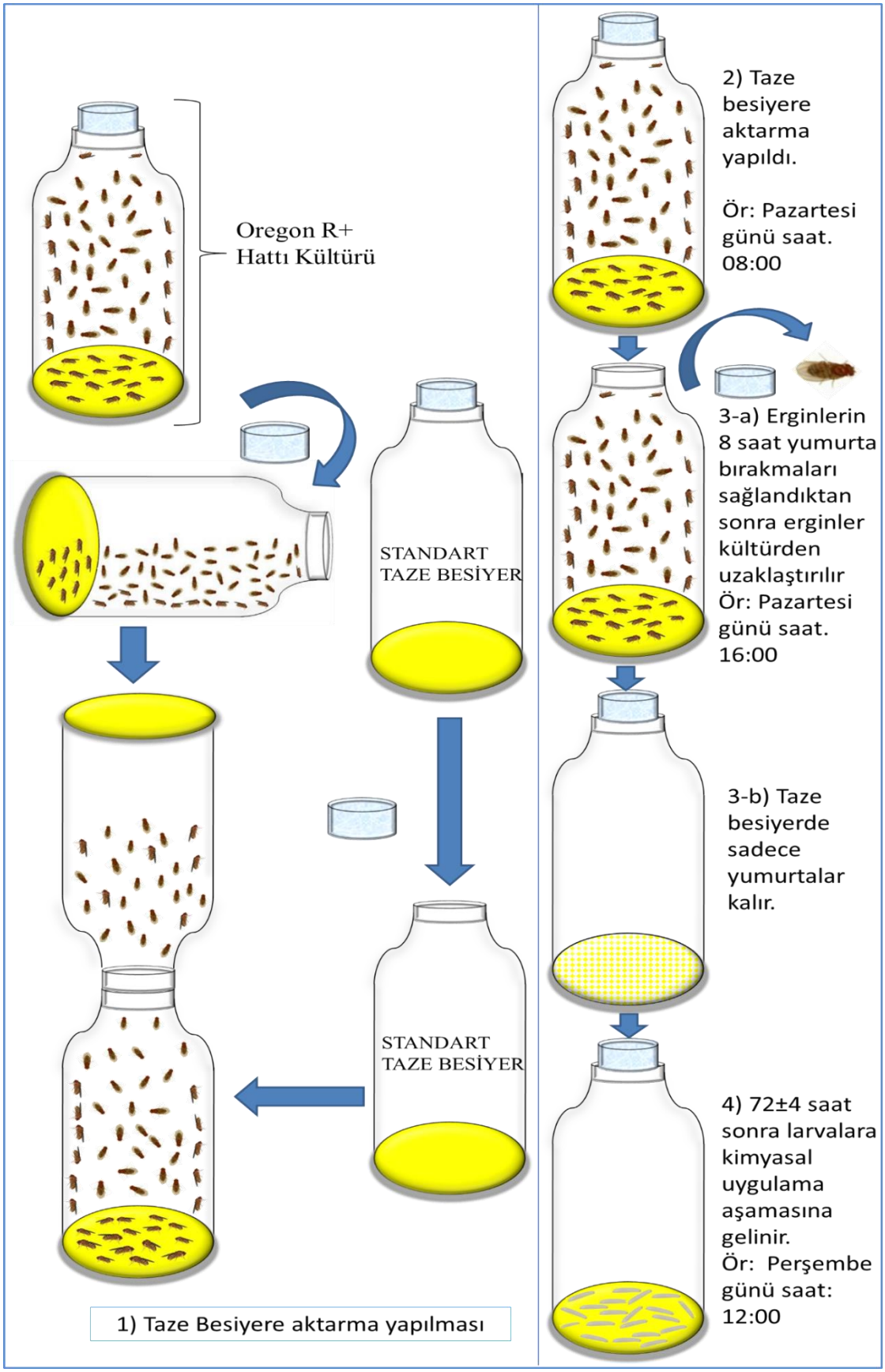
3.5.1.1. 8 Saat Yumurta Toplaması ve Yumurtaların 72±4 Saatlik Larva Haline Gelmesi Aşaması

1- Drosophila Oregon R+ hattına ait kültür ortamındaki erginlerin kuru haldeki standart taze besiyerlere aktarma işlemi yapılır.

2- Taze besiyere aktarılan *Drosophila* Oregon R+ genetik soyuna ait ergin bireylerin 8 saat süreyle 25 ^{O}C de % 60 bağıl nemdeki kültür ortamında besiyere yumurta bırakmaları sağlandı.

3- 8 saat sonrasında ergin bireyler besiyer ortamından uzaklaştırıldı. Besiyer ortamında yalnızca *Drosophila* Oregon R+ genetik soyundan yumurtalar kaldı.

4- 72±4 saat sonra erginlerin uzaklaştırıldığı besiyerdeki yumurtalar 25 ^{O}C de % 60 bağıl nem de ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık kültür ortamında 3. İnstar evresine gelir ve 72±4 saatlik larvalar toplanmış olur.



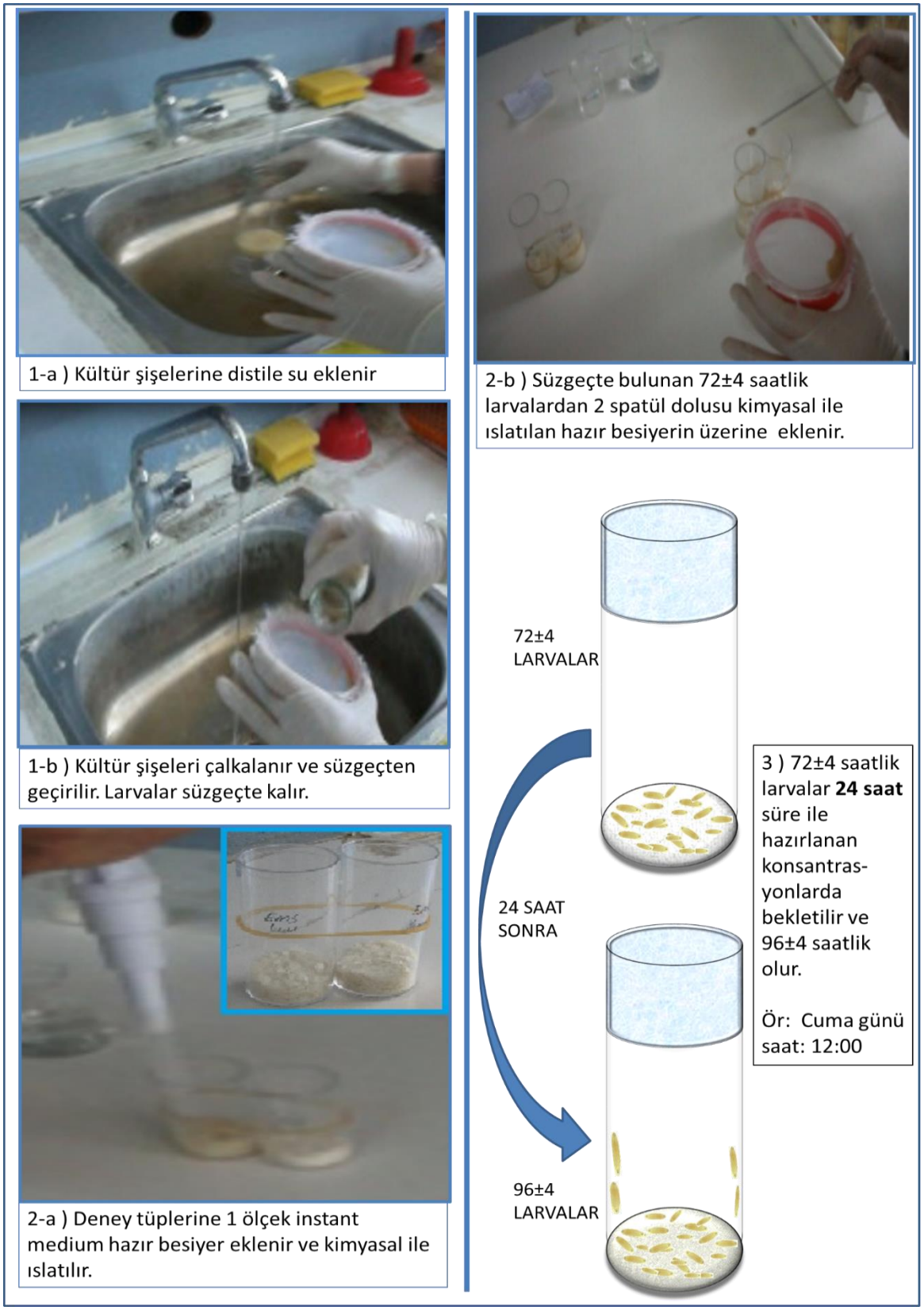
Şekil 3.19 *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında yumurta toplaması ve 72±4 saatlik larvaların elde edilmesinin şematik olarak gösterilmesi (Orijinal)

3.5.1.2. 3. İnstar Evresindeki 72±4 Saatlik Larvaların Toplanması ve 24 Saat Kimyasal uygulanması aşaması

1- 3. İnstar evresindeki 72±4 saatlik larvaların bulunduğu standart besiyer şişelerinin besiyer şişelerinin ağzında bulunan sünger tanponlar çıkarılarak her birine ayrı ayrı olacak şekilde distile su eklenip, hafifçe çalkalanıp bez süzgeçten geçirilirler ve 3. İnstar evresindeki larvalar toplanmış olur, uygulama her bir konsantrasyon için ayrı ayrı tekrar edilir.

2- Deney tüpleri içerisine birer ölçek **4.5 g** *Drosophila* instant medium/hazır besiyer eklenir ve üzerine çalışmada kullanacağımız ferrolaktat kimyasalının hazırlanan üç ayrı konsantrasyonu 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml), pozitif kontrol (4mM EMS) ve negatif kontrol grubu olarak kullanılan distile sudan ayrı ayrı olacak şekilde **9' ar ml** deney tüplerinde bulunan *Drosophila* instant medium/hazır besiyerlerin üzerine aktarılır ve besiyerler ıslatılır. Islatılan hazır besiyerin üzerine kısa bir süre bekletildikten sonra ayrı ayrı ikişer spatül yaklaşık 100' er adet 72±4 saatlik 3. İnstar evresindeki larvalar eklenmiştir. Ardından deney tüplerinin üzeri tanpon süngerlerle kapatılmıştır.

3- 3. İnstar evresindeki larvalar, **24 saat süreyle** 25 ^{0}C sıcaklık ve % 60 bağıl nemde 9'ar ml ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml)' lik konsantrasyonları, Pozitif kontrol grubu için 4 mM EMS ve negatif kontrol grubu için distile su ile ıslatılan *Drosophila* instant medium/hazır besiyere maruz bırakılmıştır.



Şekil 3.20. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında 72±4 saatlik larvaların toplanması ve 24 saat kimyasal uygulanması aşamasının gösterilmesi (Orijinal)

3.5.1.3. 96±4 Saatlik Larvaların Toplanması ve Sterilizasyon Aşaması

1- *Drosophila melanogaster* Oregon R+ larvaları 96±4 saatlik olduklarında uygulama grubundaki larvaların bulunduğu deney tüplerine ayrı ayrı olacak şekilde distile su eklenip, dikkatlice çalkalanıp, bez süzgeçten geçirilerek süzgeçte biriken larvalar distile su ile yıkanırlar.

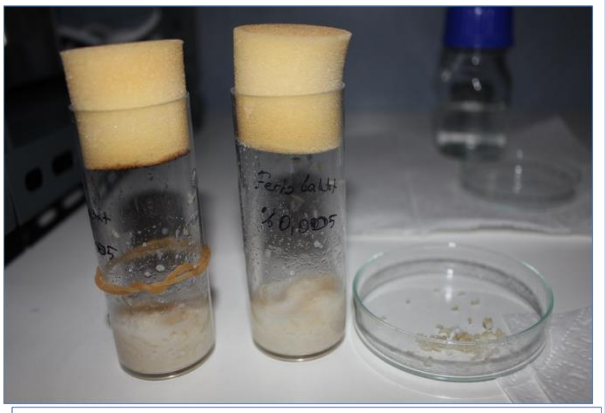
2- Daha sonra bez süzgeçte toplanan uygulama grubundaki larvalar hızlıca alınarak petri kabına aktarılırlar.

3- Petri kabına aktarılan kimyasala maruz kalmış 96±4 saatlik *Drosophila melanogaster* Oregon R+ larvaları % 5'lik sodyum hipoklorid çözeltisinde 1 dakika kadar bekletilerek steril edilmesi sağlanmış, akabinde tekrar distile su ile yıkanır ve kurutma kağıdı yardımıyla kurutulduktan sonra hemositleri izole edilecek larvalar toplanmış olur.



96±4 saatlik Oregon R+ larvalarının bulunduğu deney tüplerine distile su eklenir.

Ör: Cuma günü saat: 12:00



2-b) Larvaların petri kabına aktarılmasından sonra,

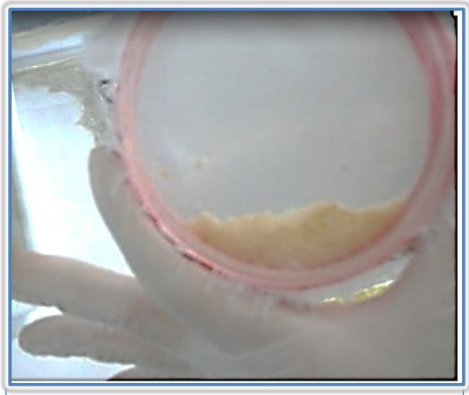


1-a) Larvaların bulunduğu deney tüpü çalkalanır ve tülbent bezli süzgeçten geçirilir.





3-a) % 5' lik hipoklorid çözeltisi hazırlanır ve,



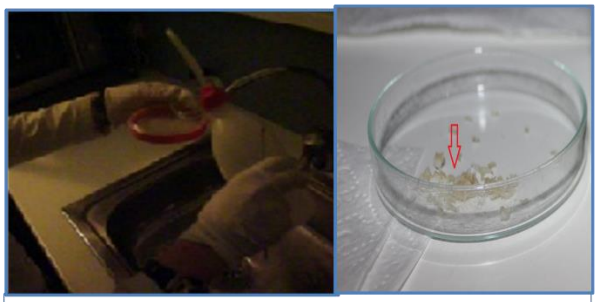
1-b) Süzgeçte bulunan 96±4 lük larvalar distile su ile yıkanır.



3-b) Larvalar % 5 lik hipoklorid çözeltisinde 1 dakika kadar bekletilerek steril edilir.



2-a) Larvalar pens yardımıyla dikkatlice toplanır.



3-c) Larvalar süzgeçten geçirilip distile su ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdı yardımıyla kurutulur ve izole edilme sürecine geçilir.

Şekil 3.21. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında 96±4 saatlik larvaların toplanarak steril edilmesi aşamasının gösterilmesi (Orijinal)

3.5.1.4. *Drosophila* Hemositlerinin İzole Edilmesi Aşaması

Hedef hücre olarak kullanılacak DNA tamir mekanizmasına sahip *Drosophila melanogasterin* Oregon R+ soyuna ait 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilmesi Irving ve ark. (2005) [69] yaptığı metod temel alınarak yapılmıştır.

1- Steril edilen her bir uygulama grubu için *Drosophila melanogasterin* Oregon R+ soyuna ait 96±4 saatlik 40 kadar larva toplanmıştır.
2- 1 adet çukur lama pipet yardımıyla 120 µl fosfat bufer salin (PBS) solüsyonu eklenir. Solüsyon eklenen çukur lam stero mikroskobu altına alınır.
3- Her bir uygulama grubu için *Drosophila melanogasterin* Oregon R+ soyuna ait 96±4 saatlik steril edilmiş larvalar, ince uçlu pens yardımıyla tek tek alınarak stero mikroskop altındaki çukur lamdaki PBS solüsyonuna batırılır, ikinci bir pens yardımıyla da *Drosophila melanogaster* Larvasının kütükila tabakasının ayrılması sağlanarak içerisindeki hemolenf ve hemositler toplanır. Bu işlem her bir uygulama grubu için 20 kadar *Drosophila* hemositinin PBS solüsyonuna boşaltılmasına kadar devam eder.
4- PBS solüsyonu içerisindeki 20 kadar *D. melanogaster* larvası hemositinin bulunduğu sıvı, çukur lamdan pipet yardımıyla alınır ve 1,5 ml' lik santirifüj tüpüne aktarılır.
5- Bu işlem ikinci kez tekrar edilir ve 1,5 ml' lik santirifüj tüpünde 240 µl PBS solüsyonu ve içerisinde izole edilmiş 40 kadar *Drosophila melanogaster'in* Oregon R+ soyuna ait larva hemositi bulunur.
6- Her bir uygulama grubu için izole edilmiş hemositlerin bulunduğu santrifüj tüpleri, daha önceden hazırlanan +4 ºC'de 10 dakika 1300 rpm' de santrifüj edilir. Santrifüj sonrası süpernatantın üst kısmı pipet yardımıyla atılarak, atılan kısım kadar soğuk PBS solüsyonu eklenir ve süspanse işlemi gerçekleştirilir. (Santifirüj cihazı +4 ºC'de 10 dakika 1300 rpm' me yaklaşık 15 dakika önceden hazır edilmelidir.)

Irving ve ark. (2005) [69] metoduna göre *Drosophila melanogaster' in* Oregon R+ soyuna ait 96±4 saatlik larvalardan İzole edilen hemositlerde DNA tek sarmal kırıklarının olup olmadığı; Tek Hücre Jel Elektroforez prosedürü temel alınarak yapılmıştır.



Şekil 3.22 *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulamasında 96±4 saatlik larva hemositlerin izole edilmesinin gösterilmesi (Orijinal)

Irving ve ark (2005) [69] metoduna göre Oregon R+ hattı yabanıl genetik soyundan bireylerin çaprazlanması ile elde edilen 3. İnstar evresindeki (72±4 saatlik) larvalara 24 saat kimyasal uygulanarak 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilmesi sağlandıktan sonra; Larva hemositlerde tek zincir DNA hasarının olup olmadığı hususlarının tespit edilmesi çalışması, Singh (1988) ve ark. [62] tarafından geliştirilen Comet assay yöntemi olarak da bilinen Tek Hücre Jel Elektroforez yöntemi prosedürü ile Demir ve Kaya (2013) [99] , Demir (2012) [121], Demir ve ark. (2013a) [122] yaptıkları çalışmalardaki küçük modifikasyonların uygulanmasıyla tamamlanmıştır.

3.5.1.5. Slaytların Hazırlanması Aşaması

1- PBS solüsyonu ile süspanse edilen hemositler düşük erime ısısına sahip low melting agaroz' dan 120 µl alınarak 100 µl hemositle hızlı bir şekilde pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

2- Ardından bir gün önceden kapladığımız normal erime ısısına sahip normal melting agaroz' lu lamlar (Şekil 3.7.) üzerine, pipet yardımıyla karışımın jele zarar verilmeden soldan sağa rodajlı kısma doğru tek çizgi halinde yayılması sağlanmıştır.

3- Lamın üzeri 24x60 mm' lik lamel 45 derece açı yapacak ve içerisinde hava kabarcığı yapmayacak şekilde kapatılmıştır.

4- Ardından preparatlar 10 dakika buz üstündeki soğuk plaka üzerinde bekletilmiştir.

5- 10 dakika sonra preparatların üzerindeki lamel' ler, lam ile paralellik arz edecek şekilde agaroz jele zarar verilmeden iki hamlede ayrılmıştır.

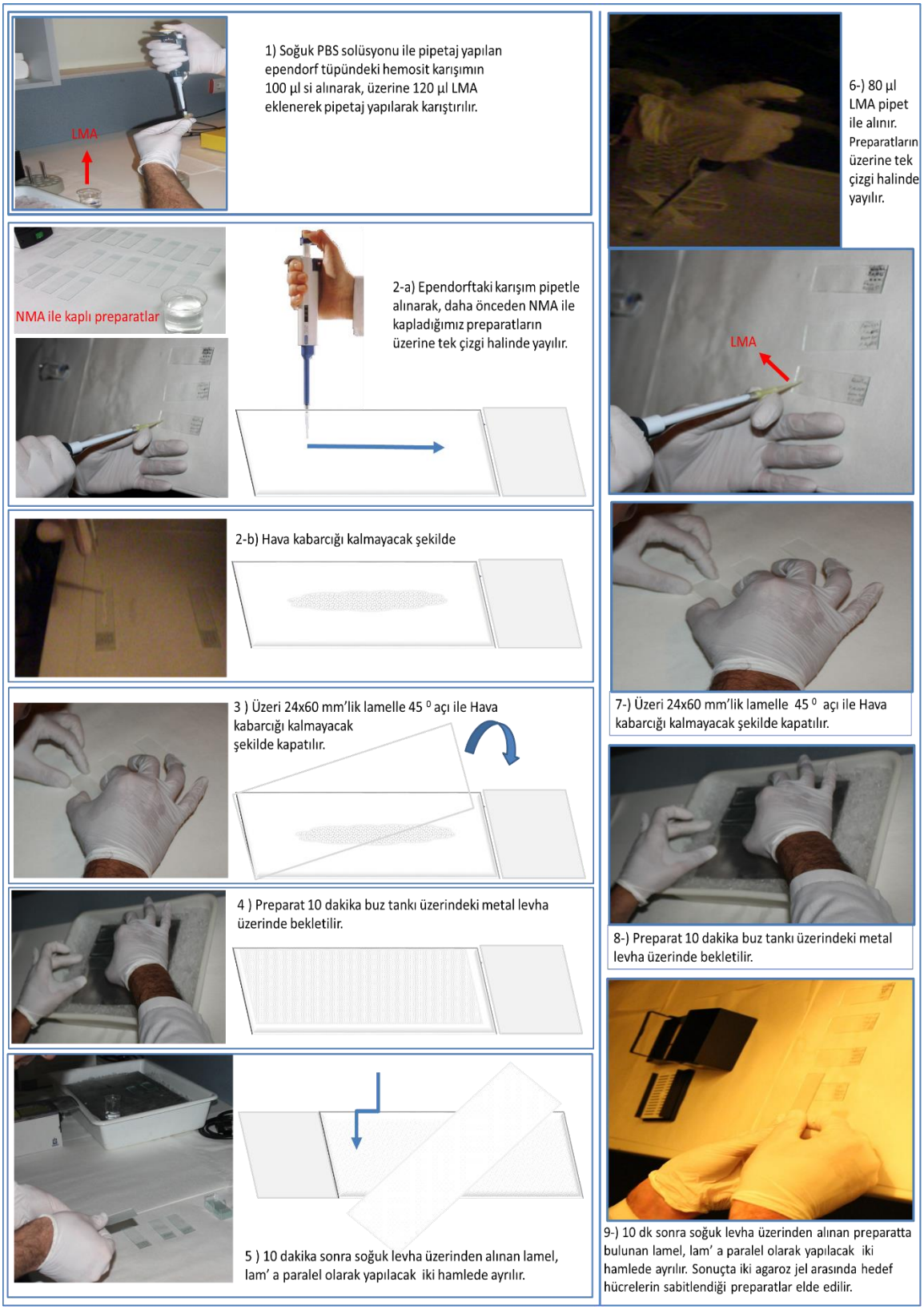
6- Lameller ayrıldıktan sonra, lam üzerine 3. katman olarak tekrar düşük erime ısısına sahip low melting agaroz (Şekil 3.6.)' dan 80 µl pipetle jele zarar vermeden soldan sağa rodajlı kısma doğru tek çizgi halinde yayılmıştır.

7- Sonra üzeri 24x60 mm' lik lamel 45 derece açı yapacak ve içerisinde hava kabarcığı yapmayacak şekilde kapatılmıştır.

8- 24x60 mm' lik lamel ile tekrar kapatılan preparatlar 10 dakika soğuk plaka üzerinde bekletilmiştir.

9- 10 dakika sonra preparatların üzerindeki lameller, lam'a paralel bir vaziyette agaroz jele zarar vermeyecek şekilde iki hamlede ayrılır ve preparatlar kurutma kağıdına dizilir.

Sonuçta; Slaytların Hazırlanması Aşamasında amaçlanmış olan, iki agaroz jel arasında hedef hücrelerin tutunduğu/sabitlendiği preparatlar elde edilir.



Şekil 3.23. *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulamasında Slaytların hazırlanmasının gösterilmesi (Orijinal)

3.5.1.6. Lizis Uygulaması Aşaması

1- Lamelleri kaldırılarak kurutma kağıdı üzerine dizilen hedef hücrelerin iki agaroz jel arasında sabitlendiği preparatlar, etrafı ışık almayan şale sabitleyicisi preparata dizilir, deney yapılacağı gün lysis solüsyonundan (Şekil 3.5.), 6 ml çıkarılarak yerine 3 ml N-Larin Sarcosine Sodium Salt ve 3 ml Triton-X eklenip pipetaj yapılarak hazırlanan ve pH= 10, + 4 ^{0}C' de bekletilen lysing solüsyonu preparatların bulunduğu şaleye yavaşça eklenir. Lysing solüsyonu bulunan ışık almayan şale içesine preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat dikkatlice yerleştirilir

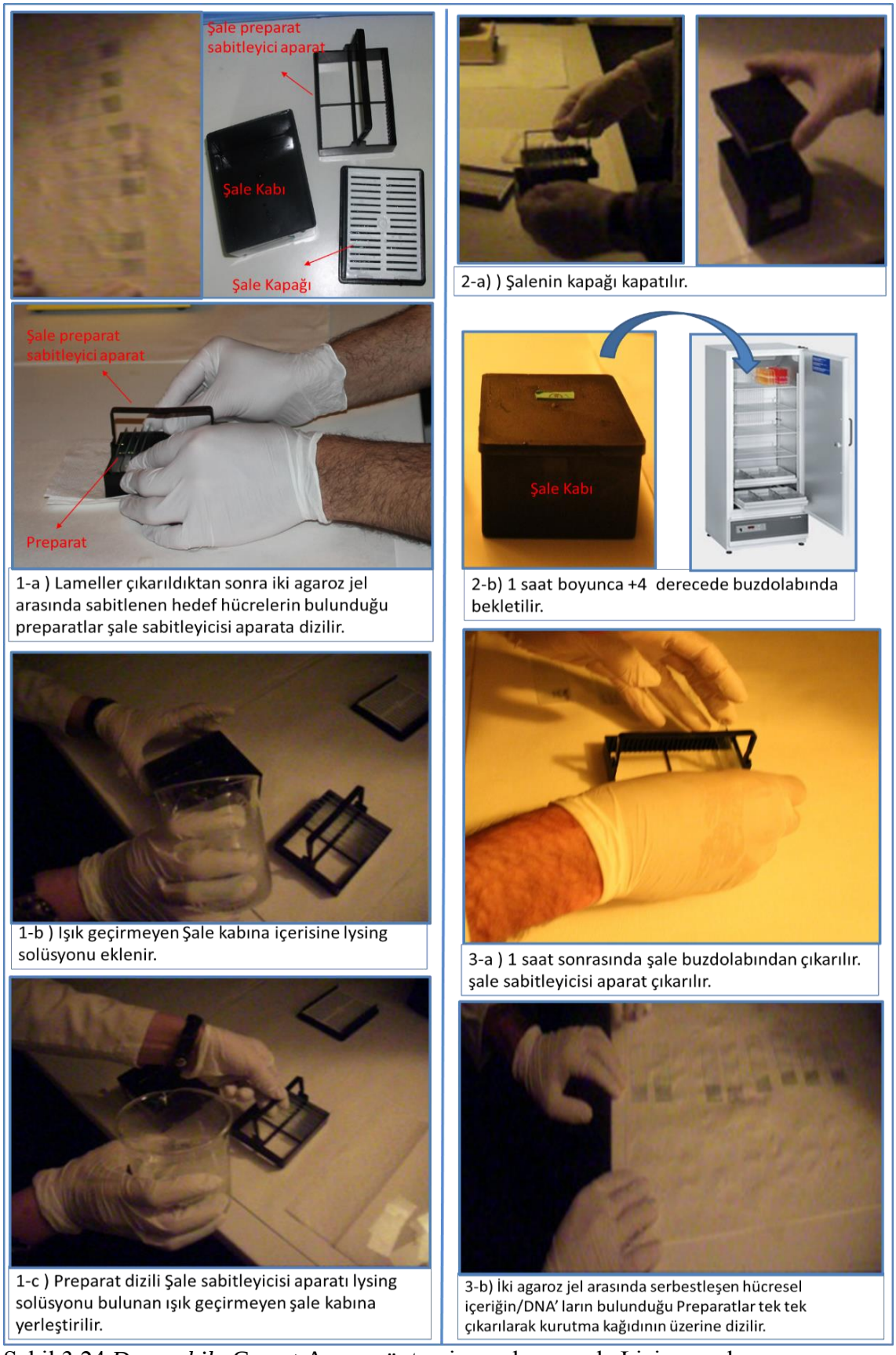
2- Preparatların bulunduğu ışık almayan şalenin kapağı kapatılarak buzdolabında 1 saat bekletilir.

3- 1 saat sonra ışık almayan şale buzdolabından çıkarılarak, şalenin kapağı açılır ve içerisinden İki agaroz jel arasında serbestleşen hücresel içeriğin/DNA' ların bulunduğu preparatlar dikkatlice çıkartılır ve kurutma kağıdına dizilir.

Sonuçta; Lizis uygulaması aşamasında amaçlanmış olan iki agaroz jel arasında tutunan/sabitlenen hedef hücrelerin yüksek konsantrasyonlarda tuz ve deterjan içeren lising çözeltisinde bir saat bekletilmek suretiyle hücre membranlarının parçalanması ve çekirdek zarının erimesi suretiyle hücresel içeriğinin agaroz jel içerisinde serbest kalması sağlanmış olur.

Lysis solüsyonundan lysing solusyonu hazırlanırken *Drosophila* hemositlerinin dokularının düşük konsantrasyonlu dokularında sitotoksik etkisi olduğu tespit edilen Dimetil Sülfoksit (DMSO) yerine, N- Larin Sarcosine Sodium Salt kullanılmıştır [100].

Lizis uygulamasında hücresel içeriğin/DNA' nın serbestleştiğinden ve ışığa karşı duyarlı olan DNA' da ek zincir kırıklarının meydana gelmemesi amacıyla, bu ve bundan sonraki basamaklar karanlık/loş ortamda yapılmıştır.



Şekil 3.24 *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulamasında Lizis uygulamasının gösterilmesi (Orijinal)

3.5.1.7. DNA Çift Sarmal Yapısının Çözülmesi Aşaması

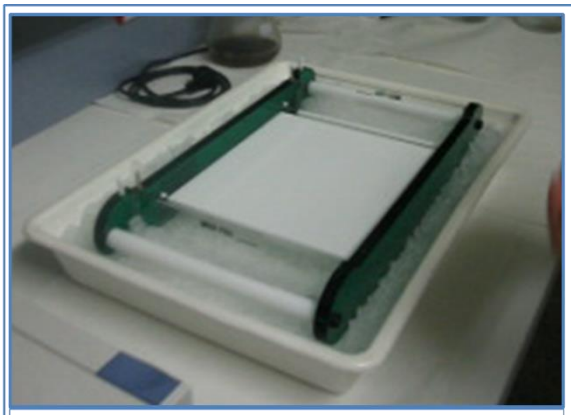
1- Elektroforez cihazı buz tankı üzerine yerleştirilerek (elektroforez cihazının ısınarak deney sonucunu etkilememesi amacıyla) içerisine +4 ^{0}C buzdolabında beklettiğimiz elektroforez solüsyonu (Şekil 3.3.) eklenmiştir.

2- Elektroforez solüsyonu eklediğimiz cihazın güç kaynağı açılarak 25 Volt 300 mA ayarlanmaya çalışılmıştır. Volt' u düşürmek için elektroforez cihazı tankından pipetle solüsyon çekilmiş, Amper' i yükseltmek için elektroforez cihaz tankına pipetle solüsyon eklenmiştir.

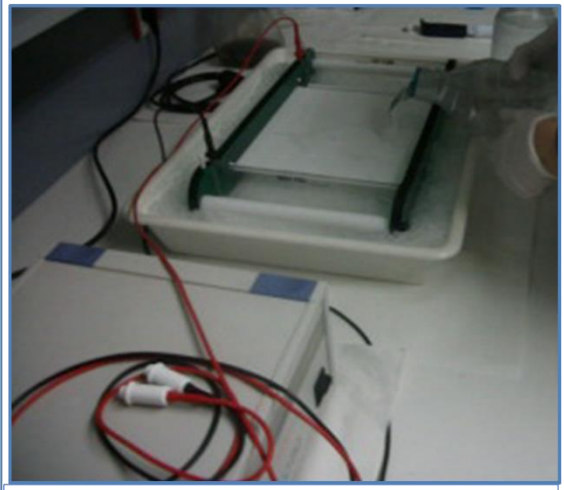
3- Kısa bir sürede elektroforez cihazında bulunan solüsyonun 25 Volt 300 mA ayarlanmasını yaptıktan sonra güç kaynağı kapatılmıştır.

4- Liziz işlemi sonrası kurutma kağıdı üzerine dizilen, İki agaroz jel arasında serbest hücresel içeriğin/DNA' ların bulunduğu preparatlar, rodajlı kısmından dikkatlice tutularak + 4 ^{0}C ve pH >13' teki elektroforez solüsyonu bulunan elektroforez cihazı tankına yerleştirilmiştir. Preparatlar, elektroforez solüsyonu içerisinde iki agaroz jel arasında serbestleşen DNA çift sarmal yapısının zincir kırıklarının bulunduğu yerden açılması amacıyla 25 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir.

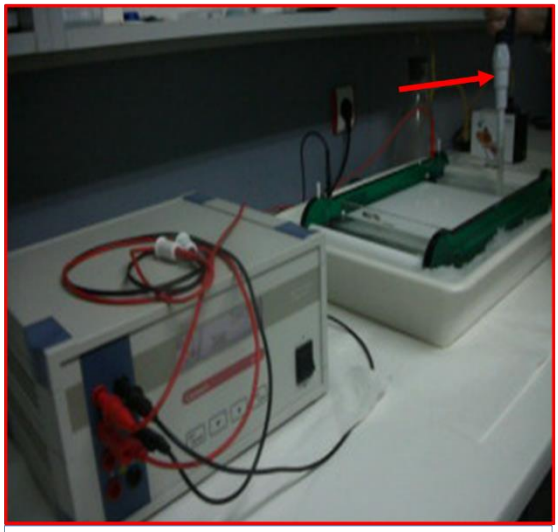
Sonuçta; DNA çift sarmal yapısının çözülmesi aşamasında amaçlanmış olan: Lizis uygulaması ile preparatlardaki agaroz jel içerisinde serbest kalan hücresel içeriğin/DNA' nın çift sarmal yapısının; uygun sıcaklık (+4 ^{0}C), uygun pH' taki (yüksek alkali ortam pH>13) elektroforez solüsyonunda belli süre (25 dakika) bekletilerek, DNA hasarının meydana geldiği zincir kırıklarının bulunduğu noktalardan açılması sağlanmış olur.



1-a) Elektroforez cihazı buz tankının üzerine yerleştirilir.



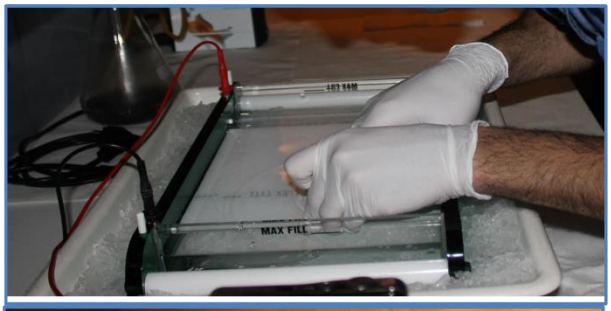
1-b) Elektroforez cihazının içerisine + 4 ^{O}C buzdolabında beklettiğimiz elektroforez solüsyonunu eklenir.

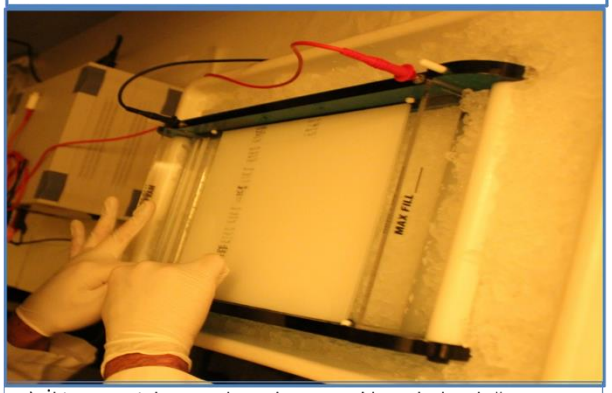


2) Güç kaynağını açılır ve solüsyonun 25 volt, 300 mA amper ayarını yapılır.

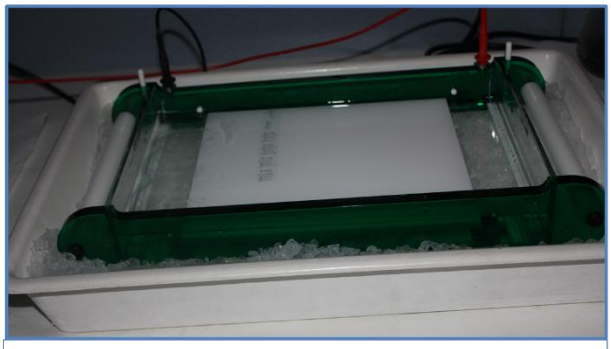


3) Pipet yardımıyla 25 volt, 300 mA amper ayarını yapılır. Ayarlama yapıldıktan sonra Güç kaynağını kapatılır.





4) İki agaroz jel arasında serbest DNA' ların bulunduğu Preparatlar elektroforez cihazına rodajlı kısmından tutularak dikkatlice yerleştirilir.



5) DNA çift sarmal yapısının zincir kırıklarının bulunduğu yerden açılması amacıyla elektroforez cihazı çalıştırılmadan Preparatlar elektroforez solüsyonu içerisinde 25 dakika karanlık ortamda bekletildi.

Şekil 3.25. *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulamasında DNA çift sarmal yapısının çözümlenmesi aşamasının gösterilmesi (Orijinal)

3.5.1.8. Elektroforez İşlemi Uygulama Aşaması

1- 25 dakika sonra Elektroforez cihazının güç kaynağı açılır Elektroforez tankı içerisindeki solüsyon Pipet yardımıyla çekilip bırakılarak 25 volt, 300 mA ayarı yapılır. Volt' u düşürmek için elektroforez cihaz tankından pipetle solüsyon çekilmiş, Amper' i yükseltmek için elektroforez cihaz tankına pipetle solüsyon eklenmiştir.

2- +4 ^{0}C, yüksek alkali ortamda (pH>13) elektroforez solüsyonunda 25 dakika bekletilerek İki agaroz jel arasında bulunan tek zincirli DNA'ların elde edildiği preparatlar, +4 ^{0}C' de, yüksek alkali ortamda (pH>13), **25 volt, 300 mA elektrik akımında** elektroforez solüsyonu içerisinde 25 dakika karanlık ortamda tutulmuştur.

3- 25 dakika sonra elektroforez cihazının güç kaynağı kapatılarak, preparatlar rodajlı kısmından dikkatlice tutularak kurutma kağıdına dizilmiştir.

Sonuçta, Elektroforez aşamasında amaçlanmış olan: iki agaroz jel arasında bulunan tek zincirli DNA'lardaki, negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının çekirdekten uzaklaştırılarak anoda doğru hareket ettirilmesiyle, preparatların değerlendirilmesi aşamasında comet görüntüsü elde edilecek yapılar elde edilir.



Şekil 3.26. *Drosophila* comet assay yöntemi uygulamasında Elektroforez aşamasının gösterilmesi (Orijinal)

Elektroforezde yüklü partiküllerin bir elektrik akımının etkisiyle birbirinden ayrılarak katedecekleri mesafe; net yük ile doğru, molekül büyüklüğü ve elektroforetik ortamın viskozitesi ile ters orantılıdır [75].

3.5.1.9. Nötralizasyon İşlemi Uygulama Aşaması

1- Rodajlı kısmından tutularak dikkatlice kurutma kağıdı üzerine dizilen preparatlar, şale preparat sabitleyicisi aparata dizilir. Işık geçirmeyen şale kabının içerisine pH = 7.5, +4 ^{0}C deki nötralizasyon solüsyonu (Şekil 3.4.) eklenir. Preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat nötralizasyon solüsyonu eklenen şale kabına yerleştirilir. Işık geçirmeyen şalenin kapağı kapatılarak +4 ^{0}C buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir. (Bu işlem 2 kez daha tekrar edilmiş ayrıca aşağıda açıklanmıştır.)

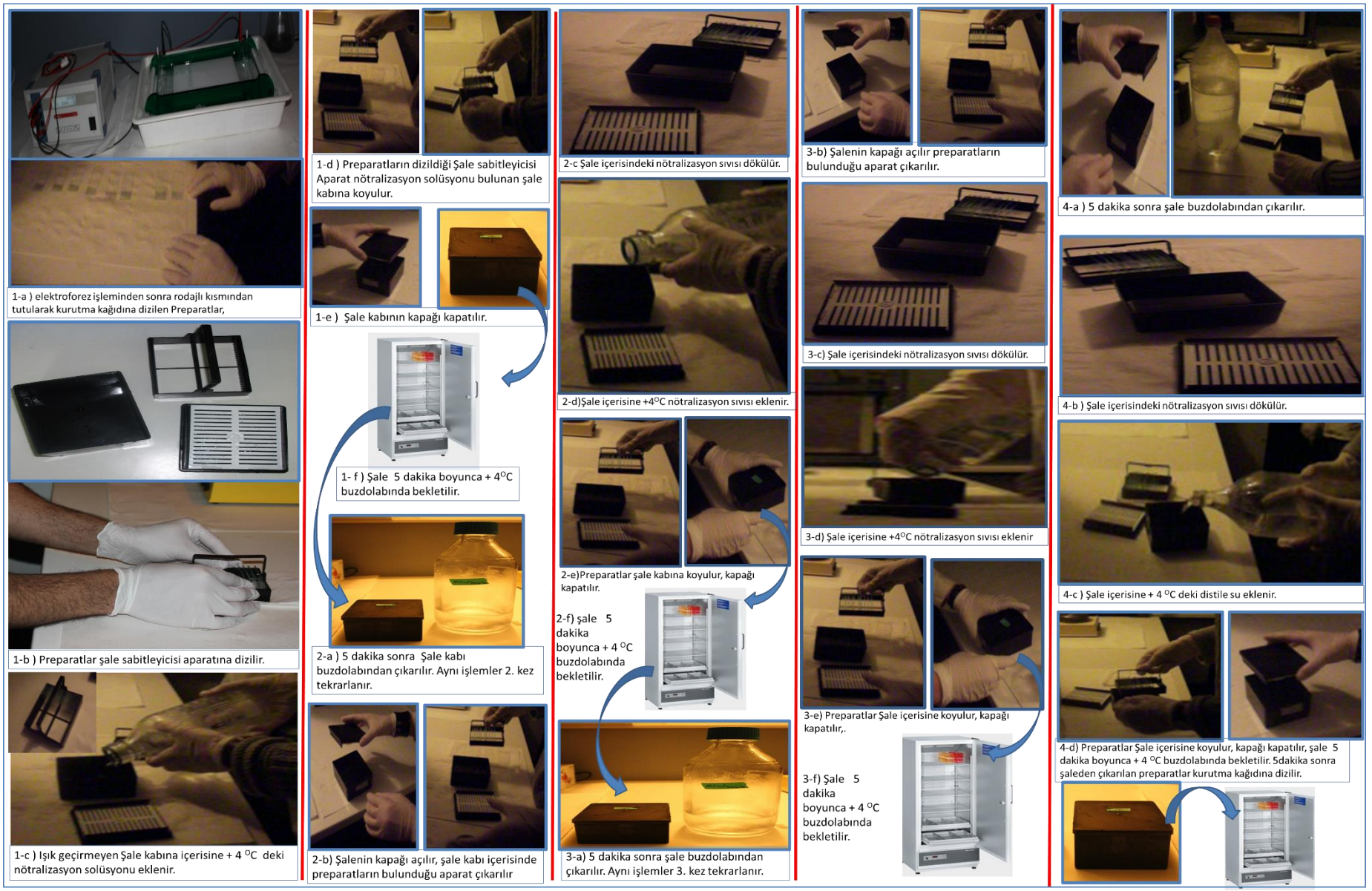
2- 5 dakika sonra, şale buzdolabından çıkarılarak şalenin kapağı açılmış, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat çıkarılarak, şale içindeki solüsyon dökülmüş ve yerine tekrar pH = 7.5, +4 ^{0}C de nötralizasyon solüsyonu eklenmiş, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat şaleye tekrar yerleştirilerek şalenin kapağı kapatılarak tekrar +4 ^{0}C buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir.

3- 5 dakika sonra, şale buzdolabından çıkarılarak şalenin kapağı açılmış, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat çıkarılarak, şale içindeki solüsyon dökülmüş ve yerine tekrar pH = 7.5, +4 ^{0}C deki nötralizasyon solüsyonu eklenmiş, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat şaleye tekrar yerleştirilerek şalenin kapağı kapatılarak tekrar +4 ^{0}C buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir.

4- 5 dakika sonra, şale buzdolabından çıkarılarak şalenin kapağı açılmış, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat çıkarılarak şale içindeki solüsyon dökülmüş ve yerine +4 ^{0}C distile su eklenmiş, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat şaleye tekrar yerleştirilerek şalenin kapağı kapatılarak tekrar +4 ^{0}C ve buzdolabında 5 dakika bekletilmiştir.

5- 5 dakika sonra, şale buzdolabından çıkarılarak şalenin kapağı açılmış, preparatların dizildiği şale sabitleyicisi aparat çıkarılarak, preparatlar rodajlı kısmından tutularak dikkatlice kurutma kağıdının üzerine dizilmiştir.

Sonuçta, Nötralizasyon aşamasında amaçlanmış olan: elektroforez işlemi sırasında ortamda bulunan yüksek konsantrasyondaki tuz ve deterjanın ortamdan uzaklaştırılması sağlanmış olur.



Şekil 3.27. *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulamasında Nötralizasyon uygulama basamağının gösterilmesi (Orjinal)

3.5.1.10. Boyama İşlemi Uygulama Aşaması

Nötralizasyon aşaması ile yüksek konsantrasyondaki tuz ve deterjanın ortamdan uzaklaştırıldığı buzdolabından çıkarılarak kurutma kağıdına dizilen şale içerisindeki preparatlar, Gichner ve ark. (2006) [74] ethidium bromid' in Tek Hücre Jel Elektroforezi yönteminde cometlerin florasan mikroskopta işaretlenmesinde diğer bağlayıcı boyalardan farklı olmadığını rapor ettiklerinden, uygulamamızda ethidium bromid kullanılmıştır.

1- Daha önceden hazırladığımız 0,01 g EtBr ve 100 ml distile su bulunan homojen karışımdan, 750 µl pipetle bir santirifüj tüpüne alınır ve üzerine 500 µl distile su ependorf tüpüne aktarılmıştır. Karşımın homojen olması amacıyla ependorf tüpündeki karışım pipetaj yapılmıştır (Şekil 3.8.)

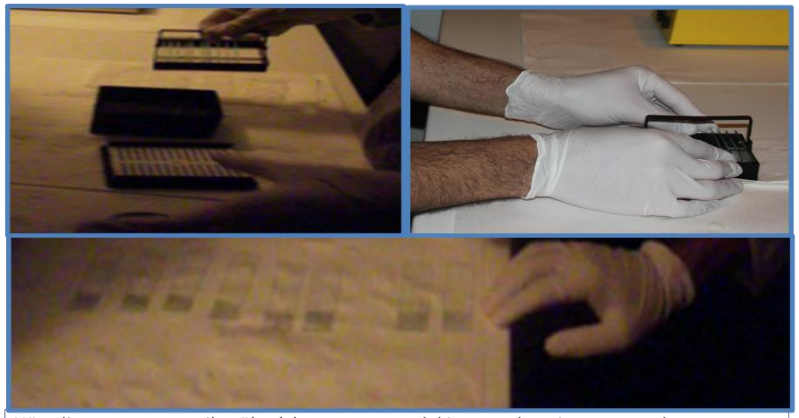
2- Ependorf tüpündeki bu karışımdan 60 µl pipet yardımıyla alınmış preparatların üzerine soldan sağa rodajlı kısma doğru preparata değmeden tek çizgi halinde hava kabarcığı bırakmadan yayılmıştır.

3- Preparatın üzeri 24x60 mm' lik lamelle 45 derece açı ile içerisinde hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatılmıştır.

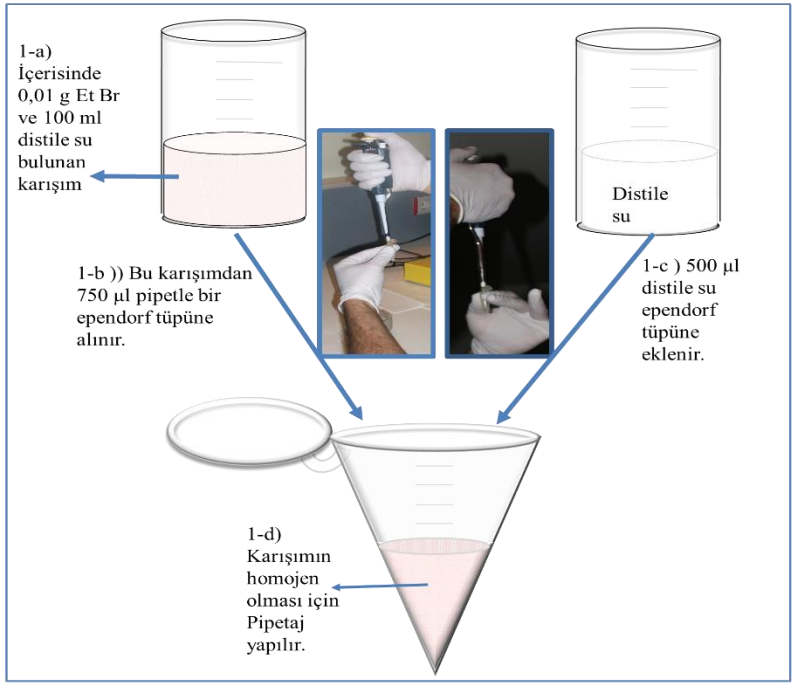
4- EtBr ile boyanan preparatlar 20 dakika buzdolabında bekletilmiştir.

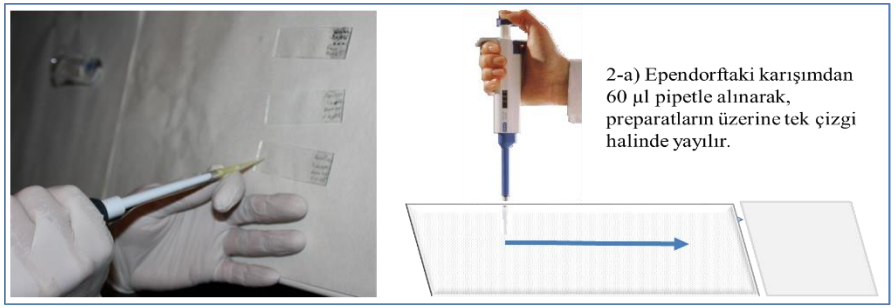
5- 20 dakika buzdolabında bekletilen preparatlar 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra sayıma hazır hale gelmiştir.

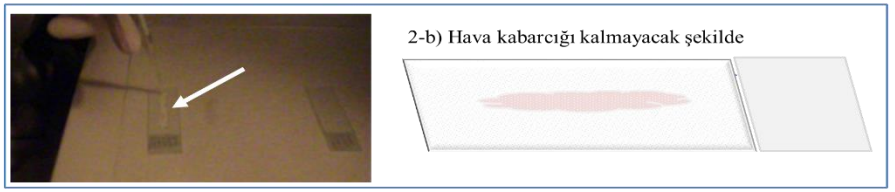
Boyama işlemi yapıldıktan kısa bir süre sonra renk verme özelliklerini kaybedeceğinden ve preparatların 4 saat içerisinde incelenmesi gerektiğinden [60,67,73], sayıma hazır preparatlar deney sonrası anlık olarak florasan mikroskop altında incelenmiştir.



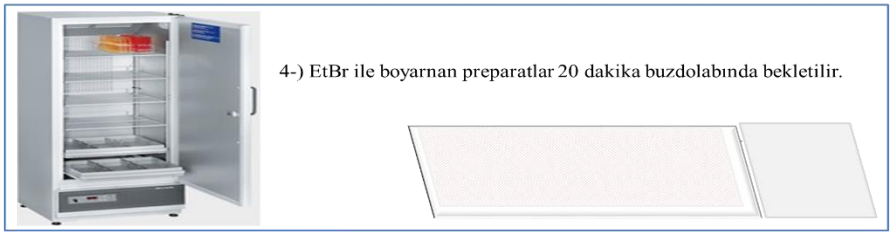
Nötralizasyon aşaması ile yüksek konsantrasyondaki tuz ve deterjanın ortamdan uzaklaştırıldığı buzdolabından çıkarılarak kurutma kağıdına dizilen şale içerisindeki preparatlar,













Şekil 3.28. *Drosophila* Comet Assay yöntemi uygulamasında hedef hücrelerin EtBr ile boyanması aşamasının gösterilmesi (Orjinal)

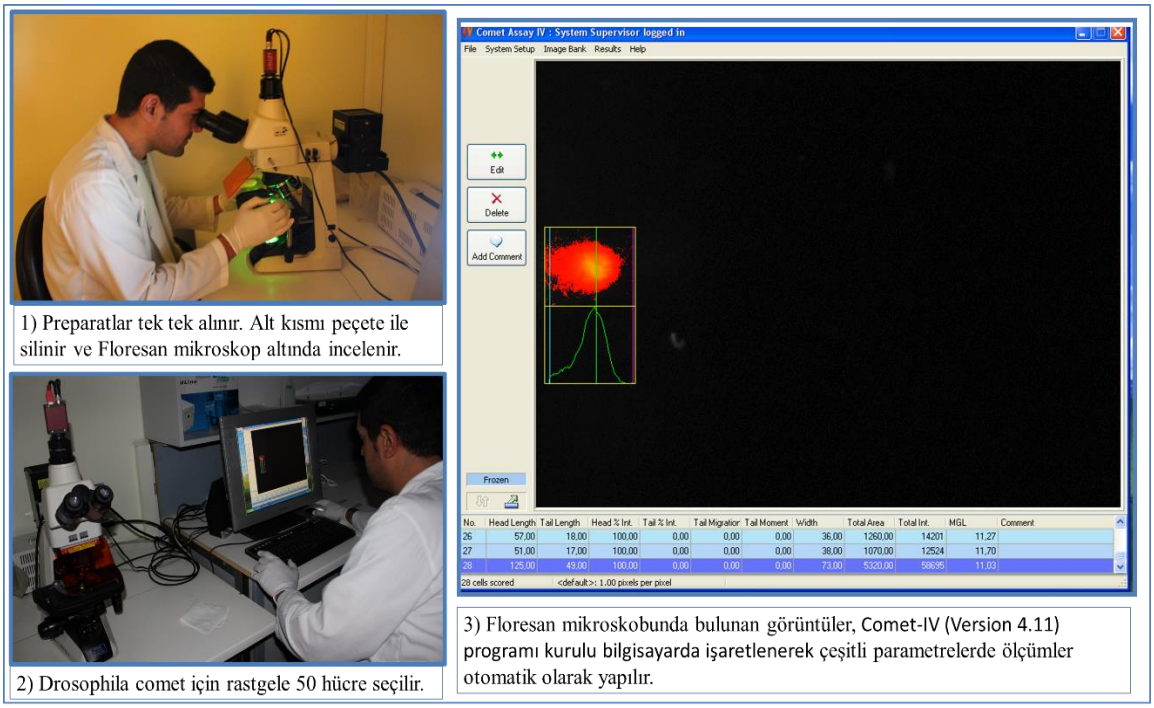
3.5.1.11. Değerlendirme Aşaması

Her bir uygulama grubuna ait preparattan, rastgele 50 hücre seçilerek Floresan mikroskopta (Nikon Eclipse E200) 400X büyütmede değerlendirilmiştir.

Dinçer ve Kankaya' nın (2005) [71] yaptıkları çalışmada, Lamların kenar kısımlarında kalan DNA'ların daha yüksek oranda hasarlı olduğu belirlendiğinden, hücreler seçilirken Lamların kenar kısımlarından ziyade orta kısımlarda yer alan DNA'lar dikkate alınmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesinde Martin ve ark. (1993) [73] görüntü analiz sistemlerinde kullanılan göç etmiş hücrelerin kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momentine göre değerlendirme parametreleri kullanılmıştır.

Her bir uygulama grubundan seçilen hücrelerin işaretlendikten sonra ölçümleri, Floresan mikroskopta Comet-IV (Version 4.11) programı ile otomatik olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçların normal dağılıp gösterip göstermediği Kolmogrov-Simirnov (K-S) testi kullanılarak kontrol edilmiştir. Sonuçların normal dağılım gösterdiği tespit edildiğinden parametrik bir test sistemi olan Paired-Samples *t*-testi ile değerlendirme yapılmıştır. Şekil 3.2-3.6'de sonuçların olduğu tablo şekil gösterilmiştir.



Şekil 3.29. Drosophila Comet Assay yöntemi uygulamasında hücrelerin işaretlenerek Mikroskop altında değerlendirme ve ölçüm yapılması aşamasının gösterilmesi (Orijinal)

4. BULGULAR

SMART testi uygulamasına ait sonuçlar ile Comet Assay testi sonuçlarına ait bulgular ayrı ayrı başlıklar altında verilmiştir.

4.1. 72 ± 4 saatlik Transheterezigot Larvalara Ferrolaktat' ın Derişimleri, Distile Su ve Etil Metan Sülfonat' ın (EMS) uygulanmasına ilişkin Kanat Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) sonuçları

72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına, ferrolaktat' ın çeşitli konsantrasyonlarının (0.005, 0.015, 0.025 (g/ml)) ayrı ayrı eş zamanlı uygulanarak metamorfoz geçirerek ergine gelişen Drosophila *melanogaster' in* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ile ergin bireylerin kanatlarında meydana gelen klonların sınıflandırılarak genotoksik etkisinin tespit edilmesi amaçlanmış, yapılan uygulama sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 3.1-3.4'de gösterilmiştir. Ferrolaktat' ın genotoksik etkisinin bulunup bulunmadığı hakkında yapılan inceleme esnasında: ferrolaktat' ın üç konsantrasyonu 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml), pozitif kontrol grubu ve negatif kontrol grubu olmak üzere her bir uygulama grubu için ayrı ayrı olmak üzere 80' ar adet normal fenotipli kanat ışık mikroskobu altında 400X büyütmede incelenmiş, elde edilen veriler, *Drosophila* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi için hazırlanmış olan paket bilgisayar programı MICROSTA yardımıyla hesaplanarak sonuçlar pozitif (+), zayıf pozitif (z), önemsiz fark (i) veya negatif (-) olarak gösterilmiştir.

72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına, distile su uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta, "11" adet küçük tek tip klon, "1" adet büyük tek tip klon, "0" adet ikiz klon olmak üzere toplam "12" adet klon belirlenmiştir. Distile su uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise "0.56" olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.1).

Çalışmamızda pozitif kontrol olarak kullanılan ve daha önceki çalışmalarda (Graf ark. (1984) [52], Kaya ve ark. (2000) [115] genotoksik olduğu belirlenen Etil Metan Sülfonat' ın (1 mM EMS); 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta "98" adet küçük tek tip klon, "69" adet büyük tek tip klon, "36" adet ikiz klon olmak üzere toplam "203" adet klon belirlenmiştir. EMS uygulamasında klon indüksiyon frekansı ise "9.58" (Bkz. Tablo 3.1) olarak hesaplanmış, EMS uygulamasından elde edilen sonuçlar ile distile su uygulamasından elde edilen verilerin MİCROSTA paket programıyla değerlendirilmesi/karşılaştırılması neticesinde tüm klon tiplerinde istatistiksel farkın önemli/anlamlı (+) olduğu ve Etil Metan Sülfonat' ın (EMS) genotoksik etki gösterdiği anlaşılmaktadır (Tablo 4.1).

Çalışmada kullanılan ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik derişiminin 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta; "21" adet küçük tek tip klon, "6" adet büyük tek tip klon, "4" adet ikiz klon olmak üzere toplam "31" adet klon belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansı ise "1,33" (Bkz. Tablo 3.1) olarak hesaplanmıştır.

Ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik derişiminden elde edilen sonuçlar ile distile su uygulamasından elde edilen verilerin MİCROSTA paket programıyla değerlendirilmesi/karşılaştırılması neticesinde, küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klonlarda artışın istatistiksel olarak önemsiz fark (i) oluşturduğu, anlamlı olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Çalışmada kullanılan ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişiminin 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta; "76" adet küçük tek tip klon, "51" adet büyük tek tip klon, "22" adet ikiz klon olmak üzere toplam "149" adet klon belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansının da doza bağlı olarak arttığı ve "5.07" (Bkz. Tablo 3.1) olarak hesaplandığı anlaşılmıştır. Ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik derişiminden elde edilen sonuçlar ile ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişiminden elde edilen sonuçların karşılaştırıldığında doz artışına paralel olarak küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam mwh, toplam klonlarda ve tüm klon tiplerindeki frekanslarda artış

gözlendiği anlaşılmış, ayrıca ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişiminden elde edilen sonuçlar ile distile su uygulamasından elde edilen verilerin MİCROSTA paket programıyla değerlendirilmesi/karşılaştırılması neticesinde, küçük tek tip klon , büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klonlarda artış gözlendiği, tüm klon tiplerinde istatistiksel farkın önemli/anlamlı (+) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

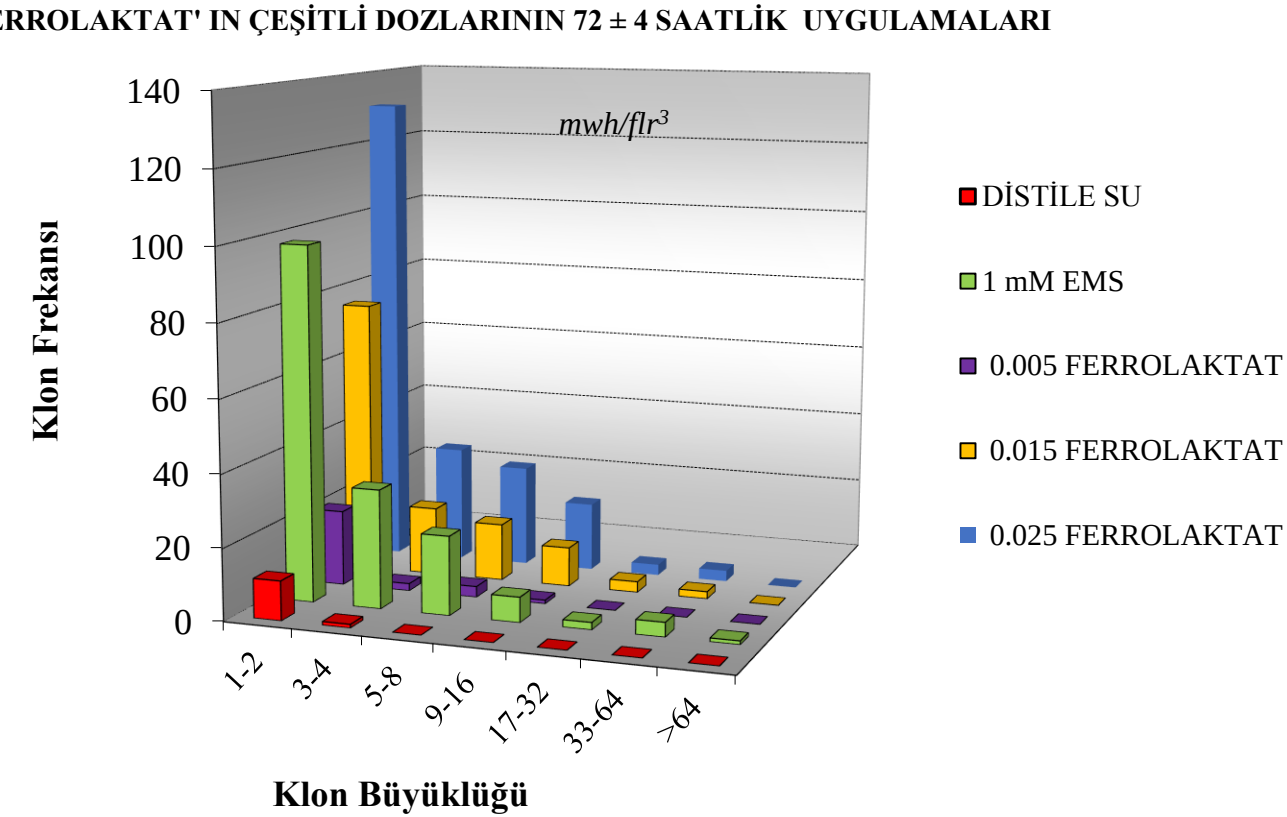
Çalışmada kullanılan ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml) 'lik derişiminin 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına uygulaması sonucunda incelenen 80 adet normal fenotipli kanatta; "131" adet küçük tek tip klon, "85" adet büyük tek tip klon, "50" adet ikiz klon olmak üzere toplam "266" adet klon belirlenmiştir. Klon indüksiyon frekansının da yine doza bağlı olarak arttığı ve "9.38" (Bkz. Tablo 3.1) olarak hesaplandığı anlaşılmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda ferrolaktat kimyasalının 0.005(g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml)' lik derişimlerinin karşılaştırılmasında uygulamadaki doz artışına paralel olarak küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam mwh, toplam klonlarda ve tüm klon tiplerindeki frekanslarda artış gözlendiği, ayrıca ferrolaktat kimyasalının 0.025' lik derişiminden elde edilen sonuçlar ile distile su uygulamasından elde edilen verilerin MİCROSTA paket programıyla değerlendirilmesi/karşılaştırılması neticesinde küçük tek tip klon, büyük tek tip klon, ikiz klon, toplam mwh ve toplam klonlarda artış gözlendiği, tüm klon tiplerinde istatistiksel farkın önemli/anlamlı (+) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml), 0.015 (g/ml), 0.025 (g/ml) üç konsantrasyonunun ayrı ayrı 72±4 saatlik *Drosophila melanogaster* mwh/flr^3 transheterezigot larvalarına uygulaması sonucunda ergine gelişen bireylerin kanatlarında oluşan mutant klonlar ile distile su uygulamasından elde edilen ergin kanatlarında meydana gelen mutant klonlar MİCROSTA paket programıyla değerlendirildiğinde/karşılaştırıldığında ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml), 0.025' lik konsantrasyonlarında farkın önemli/anlamlı (+) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ferrolaktat' ın doza bağlı olarak mutant klon sayısında bir artışa neden olduğu, DNA' nın yapısına etki ederek nokta mutasyon, delesyon ve somatik rekombinasyona sebep olduğu, sonuçta genotoksik risk ve sağlık açısından çeşitli sorunlar doğurabileceği tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

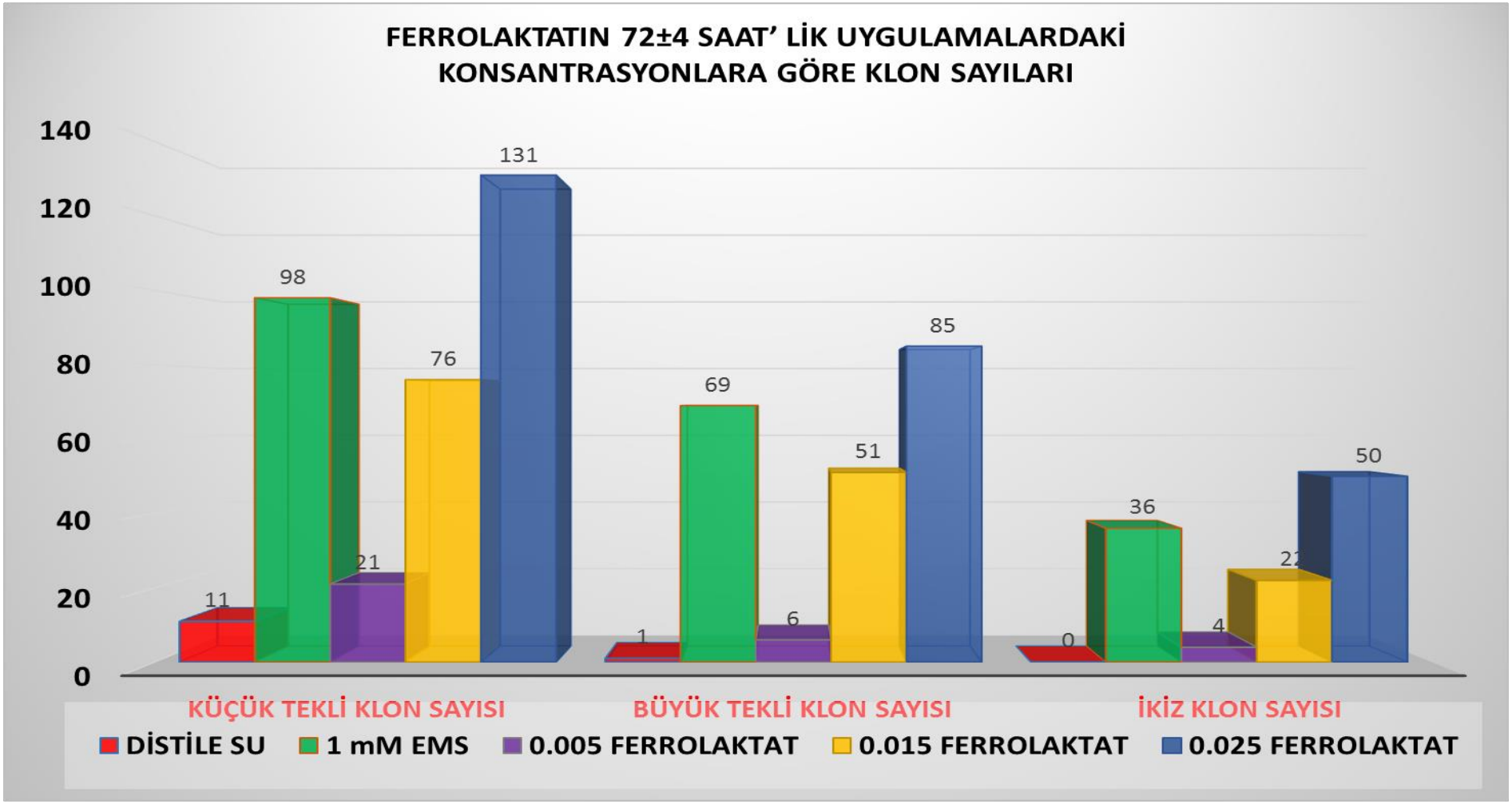
Tablo 4.1. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* kanat somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) sonuçlarına ait istatistiksel bilgiler

Dozlar		Kanat Sayısı (N)	Küçük tek tip klonlar (1-2 hücre) (*m*=2)			Büyük tek tip klonlar (> 2 hücre) (*m*=5)			İkiz klonlar (*m*=5)			Toplam *mwh* klonları (*m*=2)			Toplam klonları (*m*=2)			Klon İndüksiyon Frekansı (10^5 hücre)
			No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	No	Fr	D	
Distile su		80	11	(0.14)		1	(0.01)		0	(0.00)		11	(0.14)		12	(0.15)		0.56
1 mM EMS		80	98	(1.23)	+	69	(0.86)	+	36	(0.45)	+	187	(2.34)	+	203	(2.54)	+	9.58
Ferrolaktat	0.005	80	21	(0.26)	i	6	(0.08)	i	4	(0.05)	i	26	(0.33)	+	31	(0.39)	+	1.33
	0.015	80	76	(0.95)	+	51	(0.64)	+	22	(0.28)	+	99	(1.24)	+	149	(1.86)	+	5.07
	0.025	80	131	(1.64)	+	85	(1.06)	+	50	(0.63)	+	183	(2.29)	+	266	(3.33)	+	9.38

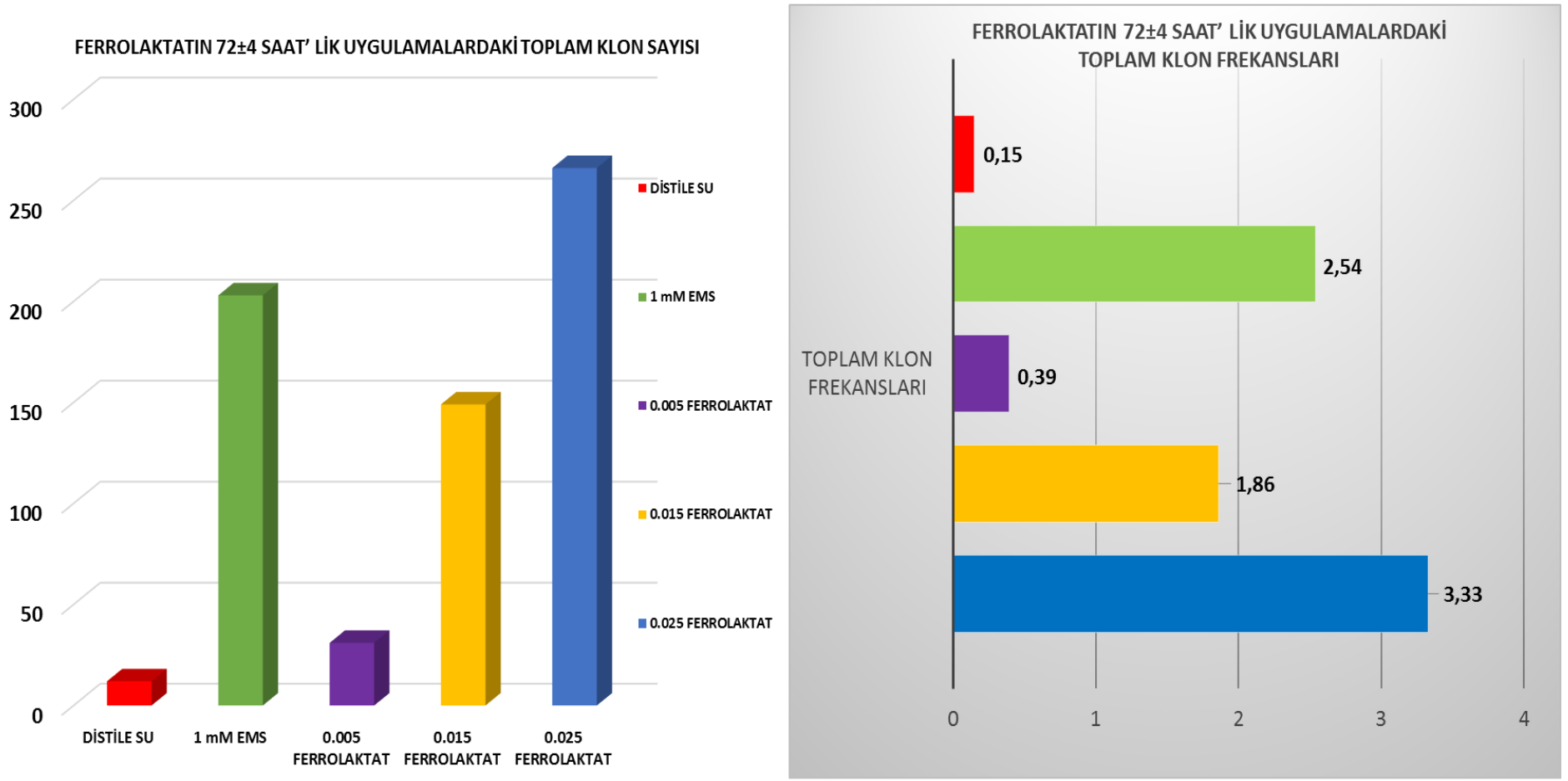
[Fr. : Frekans; D. : İstatistik sonuçlarının gösterimi (Frei ve Würgler 1988)]
[(+) : pozitif; (-): negatif; (i): önemsiz fark; *m*=çarpım faktörü; olasılık düzeyi= 0.05]



Şekil 4.1. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin kanatlarında SMART testine göre meydana getirdiği sınıflandırılmış klonların büyüklüklerinin ve frekanslarının karşılaştırılması



Şekil 4.2. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin kanatlarında meydana getirdiği sınıflandırılmış klonların karşılaştırılması



Şekil 4.3 Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* ergin bireylerinin kanatlarında meydana getirdiği toplam klon sayıları ve toplam frekans sayılarının karşılaştırılması

4.2. 72 ± 4 Saatlik Oregon R+ Genetik Soyundan Larvalara Ferrolaktat' ın Derişimleri, Distile Su ve Etil Metan Sülfonat' ın (EMS) 24 Saatlik Uygulanması ve *Drosophila* Comet Yöntemi İle Elde Edilen Sonuçlar

72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster' in Oregon R+ genetik soyundan* larvalara, ferrolaktat' ın çeşitli konsantrasyonlarını (0.005, 0.015, 0.025 (g/ml)) içeren besiyerlere 24 saat maruz bırakılması ve 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilerek uygulanan kimyasalın genotoksik etkisinin ve tek iplik DNA hasarının tespit edilmesi amaçlanmış, uygulama sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 'de gösterilmiştir.

Ferrolaktat' ın genotoksik etkisi ve tek iplik DNA hasarına neden olup olmadığı konusunda yapılan inceleme esnasında: 72±4 saatlik larvaların 24 saat süreyle ferrolaktat'ın üç konsantrasyonu (0.005, 0.015, 0.025 (g/ml)), pozitif kontrol grubu ve negatif kontrol grubunu içeren besiyerlere maruz bırakıldıktan sonra her bir uygulama grubu için ayrı ayrı olmak üzere *Oregon R+* genetik soyundan 96 ± 4 saatlik larvalardan yaklaşık 40' ar tanesinin larva hemositi izole edilmiş, uygulanan kimyasalların genotoksik etkisinin ve tek iplik DNA hasarının tespit edilmesinde comet assay test sistemi uygulanmış, Değerlendirme parametresi olarak negatif kontrol grubuna ait Distile suya ait çalışmadan elde edilen kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (μm) ve kuyruk uzunluğu (μm) verilerinin istatiksel olarak karşılaştırılması ve değerlendirilmesiyle yapılmıştır.

Yapılan tüm uygulama sonucunda elde edilen veriler test sistemlerinin bulunduğu sonuçların otomatik olarak hesaplandığı SPSS paket programı (versiyon 15.0) kullanılmıştır. Comet Assay testi ile yapılan tüm uygulamalara ait Kolmogrov-Simirnov (K-S) testi sonucunda Z değeri $P > 0.05$ olarak elde edildiğinden ve sonuçların normal dağımım gösterdiği anlaşıldığından, uygulamalarda elde edilen veriler parametrik bir test sistemi olan Paired-Samples *t*-testi ile değerlendirmeye tabi tutulmuş, İstatistiksel olarak önem düzeyi % 5 olarak ele alınmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2 'de gösterilmiştir.

72±4 saatlik *Drosophila melanogasterin Oregon R+ genetik soyundan* larvaların, ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml) içeren besiyerlere 24 saat maruz bırakılması ve 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilerek comet assay test sistemi ile DNA hasarının ve genotoksik etkinin tespit edilmesi amacıyla yapılan karşılaştırma sonucunda; elde edilen veriler ile negatif kontrol grubuna ait uygulama sonucunda elde edilen verilerin karşılaştırılmasında, ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik derişiminin distile su uygulmasına göre kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamaları arasında Paired Samples T Testine göre (P>0,05 den büyük bir değer çıktığı tespit edildiğinden) istatistiksel anlamda bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2.).

72±4 saatlik *Drosophila melanogaster' in Oregon R+ genetik soyundan* larvaların, ferrolaktat kimyasalının 0.015 (g/ml) içeren besiyerlere 24 saat maruz bırakılması ve 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilerek comet assay test sistemi ile DNA hasarının ve genotoksik etkinin tespit edilmesi amacıyla yapılan karşılaştırma sonucunda; ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişiminin; distile su ve ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik derişimi uygulamasına göre kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamalarında belirgin bir artış gösterdiği ancak, ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişiminden elde edilen veriler ile negatif kontrol grubuna (distile su) ait uygulama sonucunda elde edilen verilerin Paired Samples T Testi karşılaştırmasına göre (*P>0,05 den büyük bir değer çıktığı tespit edildiğinden*) aralarında istatistiksel anlamda bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.2.).

72±4 saatlik *Drosophila melanogaster' in Oregon R+ genetik soyundan* larvaların, ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml) içeren besiyerlere 24 saat maruz bırakılması ve 96±4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilerek comet assay test sistemi ile DNA hasarının ve genotoksik etkinin tespit edilmesi amacıyla yapılan karşılaştırma sonucunda; ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml)' lik derişiminin; distile su ile ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml) ve 0.015 (g/ml)' lik derişimi uygulamasına göre kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamalarında belirgin bir artış gösterdiği, ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml)' lik derişiminden elde edilen veriler ile negatif kontrol grubuna (distile su) ait uygulama sonucunda elde edilen verilerin Paired Samples T Testi karşılaştırmasına göre (*P<0,05 den büyük bir değer çıktığı tespit edildiğinden*) aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu tespit ediliştir (Tablo 4.2.).

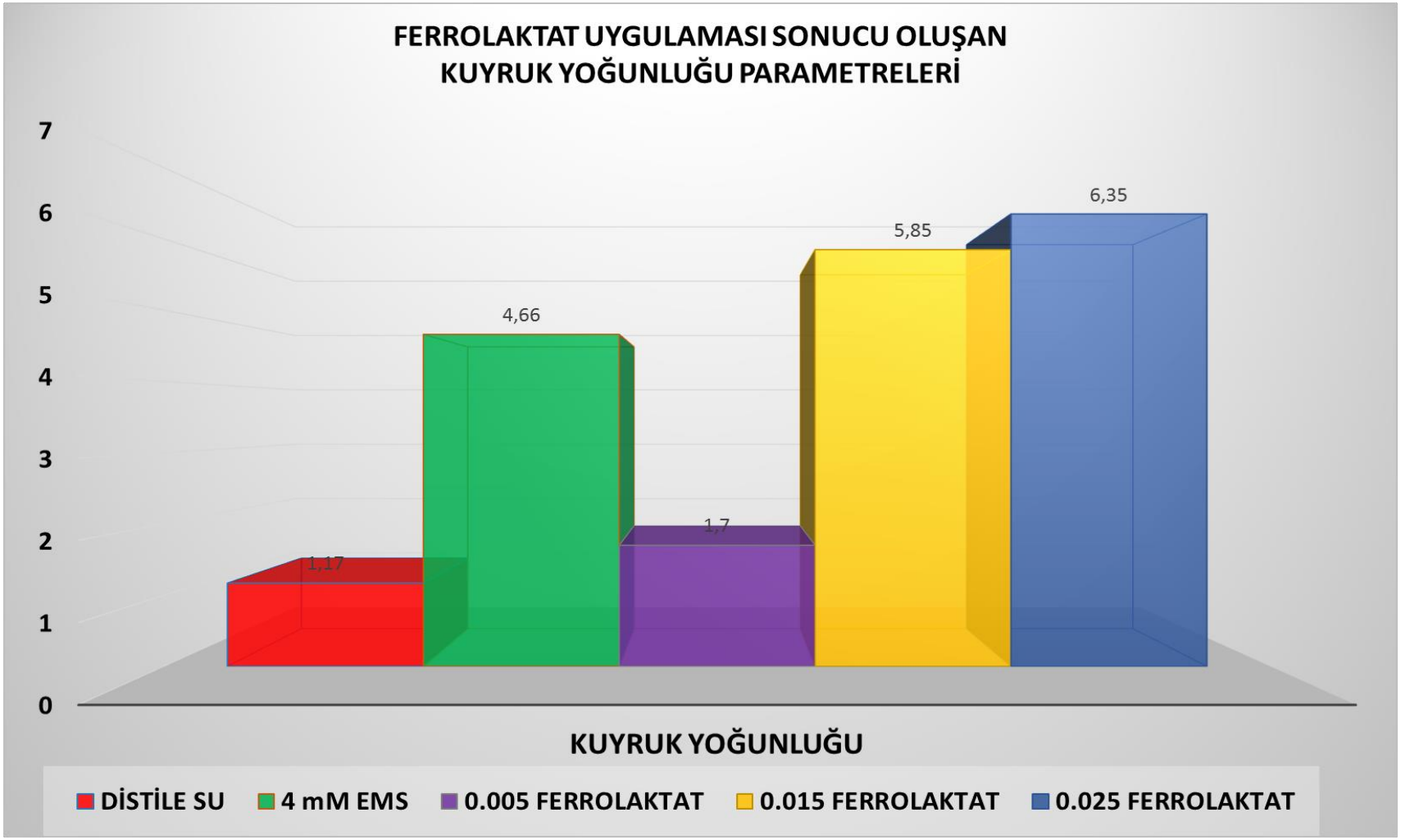
Ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml) derişimi ile kontrol grubuna ait kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (μm) ve kuyruk uzunluğu (μm) ortalamalarına ait sonuçları DNA hasarının ve genotoksik etkinin tespit edilmesi amacıyla yapılan karşılaştırma sonucunda ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik ve 0.015 (g/ml)' lik derişimlerine göre kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (μm) ve kuyruk uzunluğu (μm) ortalamalarında bir artış gözlendiği ve doz artışına bağlı olarak DNA hasarında artış gözlendiği, genotoksik etkinin arttığı, Paired Samples T Testine göre $P<0,05$ gibi bir değer çıktığı tespit edildiğinden ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml) derişiminin kontrol grubu ile aralarında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olduğu, DNA hasarının artış gösterdiği tespit ediliştir.

Ferrolaktat' ın tüm derişimlerine ait sonuçlar incelendiğinde, ferrolaktatın doz artışına bağlı olarak DNA hasarında artışa neden olduğu ve 0.025 (g/ml) derişim uygulamasında anlamlı sonuçlar elde edildiği, bu sebeple genotoksik risk oluşturabileceği tespit edilmiştir. SPSS programı yardımıyla Paired Samples T Testi sonuçlarına göre 0.025 (g/ml)' lik konsantrasyonun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında genotoksik etkinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

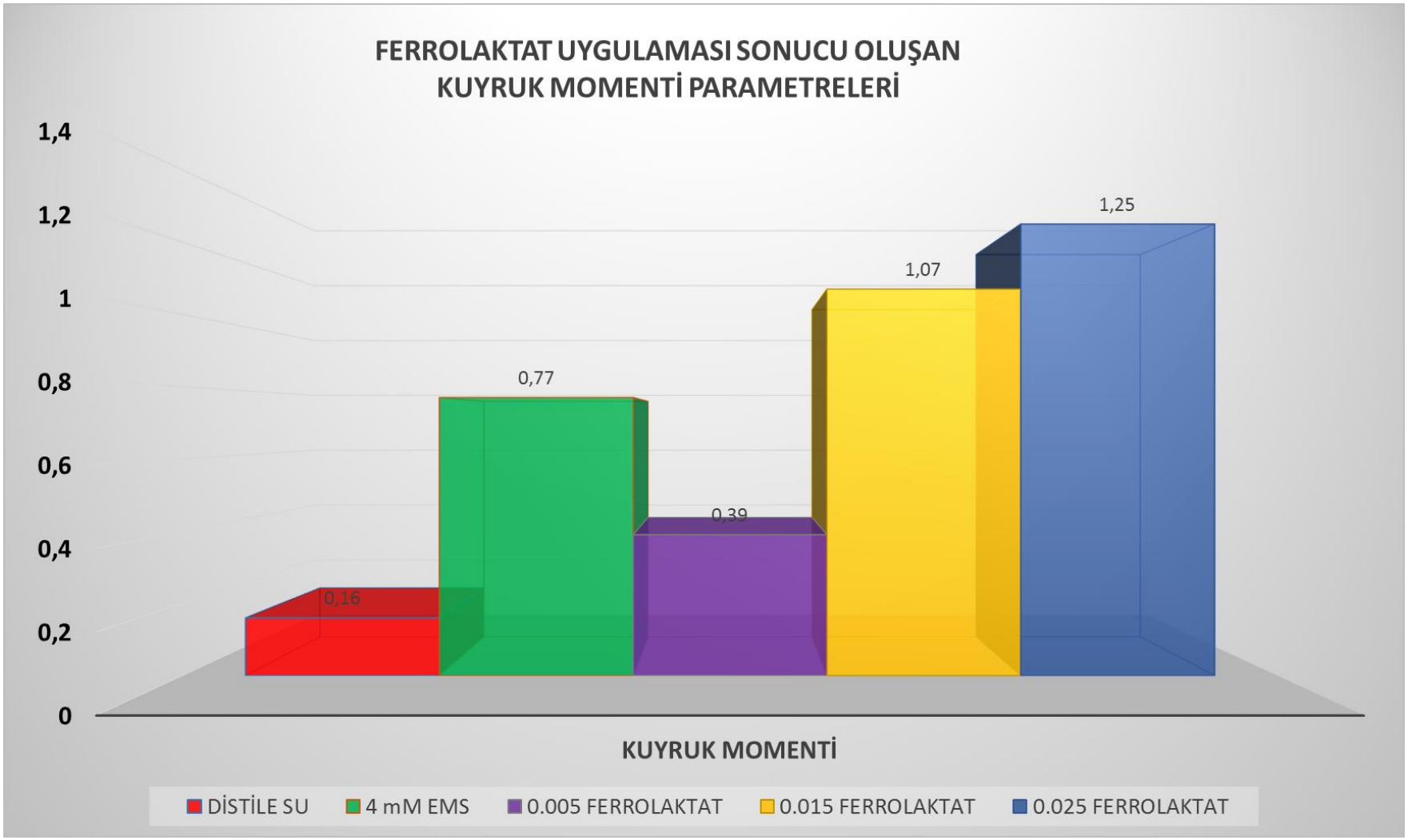
Tablo **4.2** . Ferrolaktat ,Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Comet Assay yöntemi ile kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu, kuyruk momenti ortalamalarına ait istatistiki veriler

Konsantrasyon		**Kuyruk Yoğunluğu (%)**	**Kuyruk Momenti (µm)**	**Kuyruk Uzunluğu (µm)**
Negatif Kontrol **Distile Su**		1.17 ± 0.49	0.16 ± 0.07	22.76 ± 0.93
Pozitif Kontrol **4 mM EMS** (EMS: Etil Metan Sülfonat)		4.66 ± 1.49* *(P = 0.033)*	0.77 ± 0.35 *(P = 0.092)*	29.30 ± 1.01* *(P = 0.000)*
Ferrolaktat (E 585)	**0.005**	1.70 ± 0.83 *(P = 0.589)*	0.39 ± 0.27 *(P = 0.0398)*	21.60 ± 1.45 *(P = 0.506)*
	0.015	5.85 ± 2.33 *(P = 0.054)*	1.07 ± 0.52 *(P = 0.087)*	24.00 ± 1.37 *(P = 0.445)*
	0.025	6.35 ± 1.79* *(P = 0.005)*	1.25 ± 0.57 *(P = 0.063)*	26.86 ± 1.54* *(P = 0.037)*

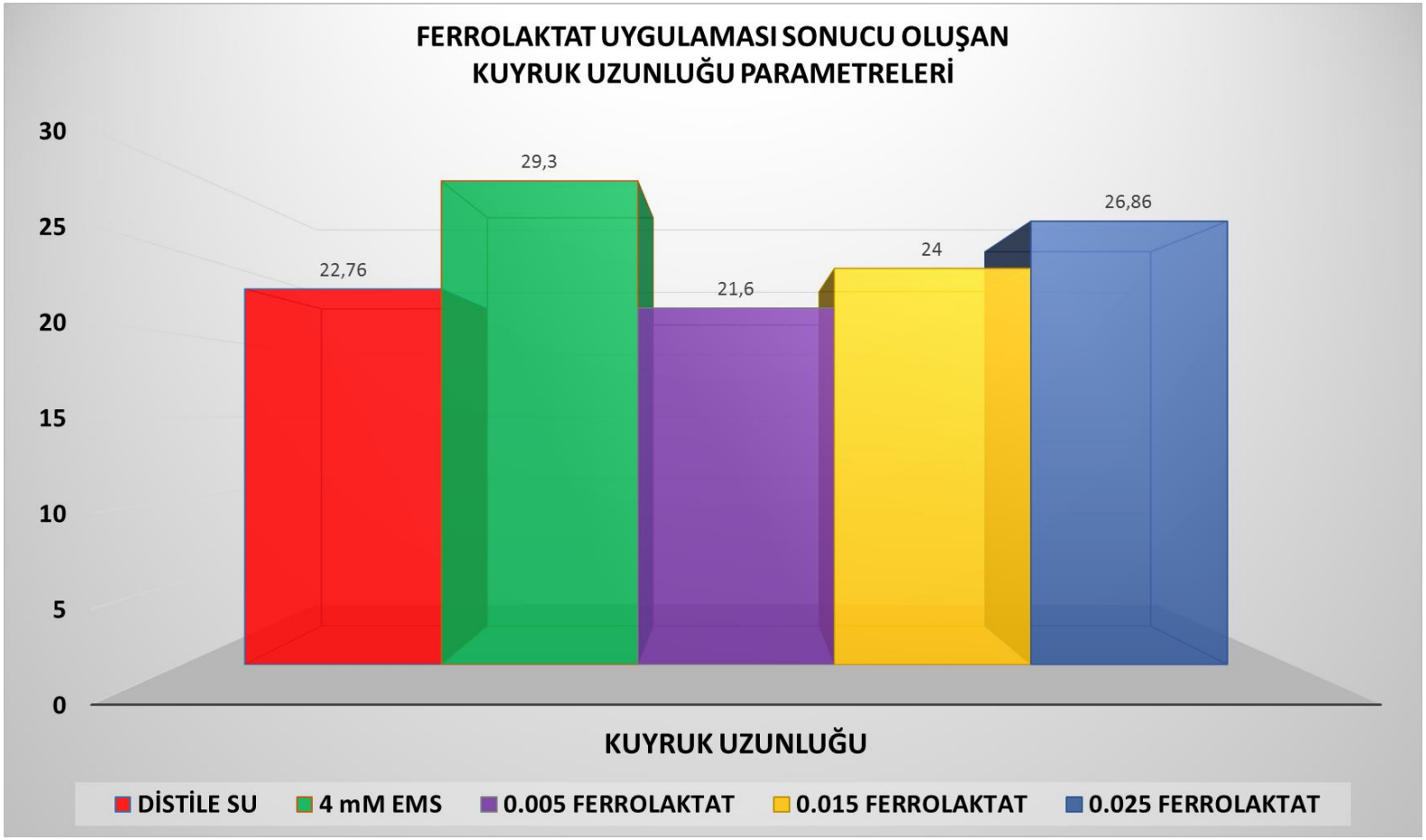
Distile suya göre P < 0.05 düzeyinde anlamlı (Paired-Samples T Testi),
Aritmetik Ortalama ± standart hata



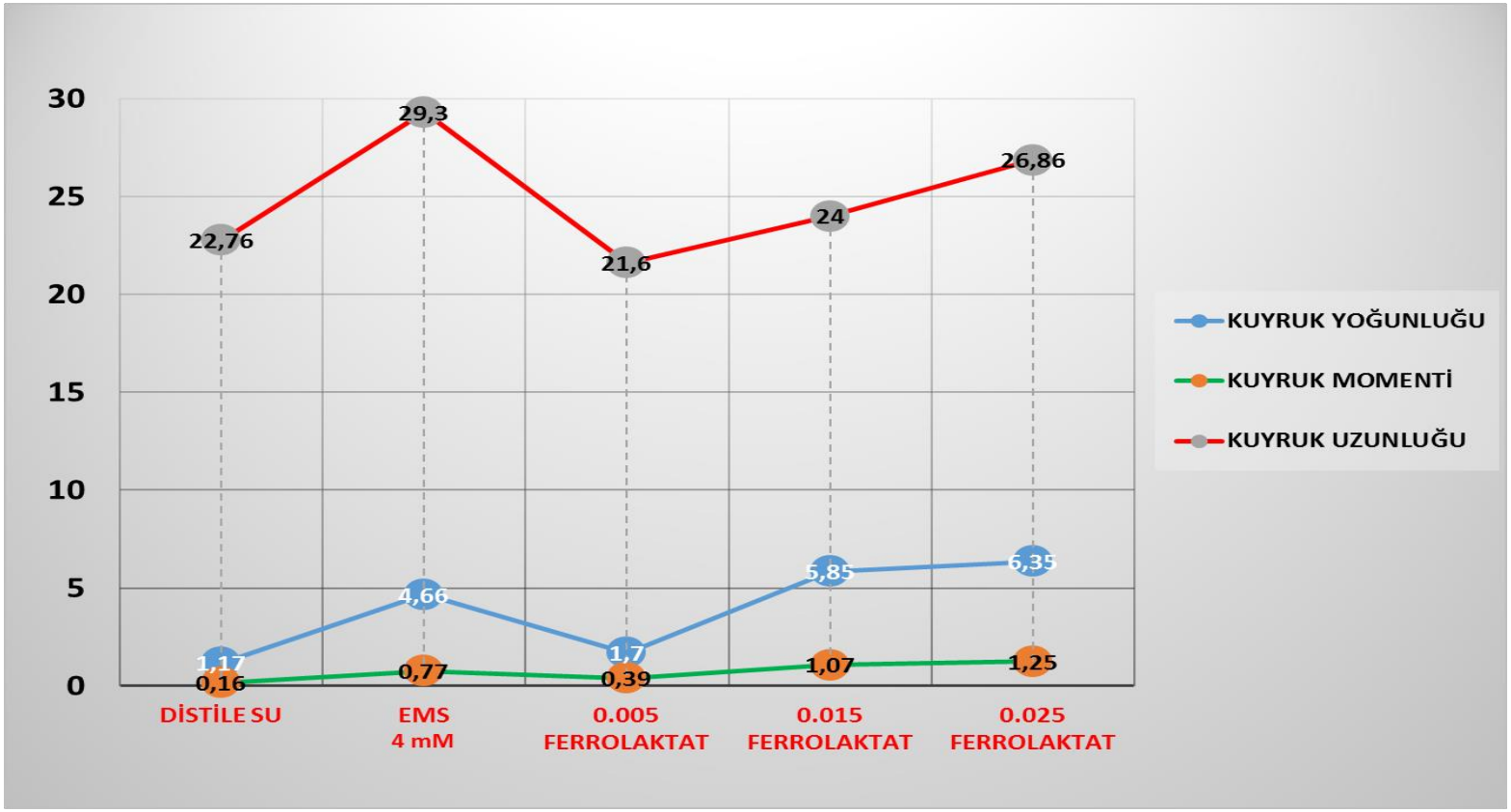
Şekil 4.4 Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde Comet Assay yöntemi kuyruk yoğunluğu ortalamalarına ait verilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.5. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde Comet Assay yöntemi ile kuyruk momenti ortalamalarına ait verilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.6. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde Comet Assay yöntemi ile kuyruk uzunluğu ortalamalarına ait verilerinin karşılaştırılması



Şekil 4.7. Ferrolaktat, Distile su ve EMS uygulamalarının *Drosophila melanogaster* Hemositlerinde Comet Assay yöntemi ile kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ortalamalarına ait verilerinin karşılaştırılması

TARTIŞMA VE SONUÇ

Türel (2013) gıda katkı maddesi ferrolaktat' ın *Drosophila melanogaster*' in yaşam döngüsündeki larva, pupa ve ergin sayıları üzerindeki etkileri hakkında yaptığı çalışmada [94], ferrolaktat' lı besiyer ile beslenen *Drosophila* sineklerinin belli konsantrasyondan sonra larva, pupa ve erginlerin gelişimini negatif yönde etkilediği ve ölümlere neden olduğu, ferrolaktat' ın 0.010' dan büyük derişimlerini içeren besiyerlerle beslenen flr^3 genotipli sineklerde tamamen olmasa da yabanıl tiplerde kesin letal doz olarak saptandığı, yabanıl tip *Drosophila'* nın ferrolaktat' a karşı flr^3 genotipli sineklerden daha hassas olduğu, kontrolsüz aşırı dozdaki ferrolaktat' ın hücrelere zarar verdiği, *Drosophila'* da ölümlere yol açtığı, ancak "***yüksek dozdaki ferrolaktat' ın zarar mekanizması hakkında fikir edinilemediği, DNA' da meydana gelebilecek mutasyonların ve hasarın SMART ve Comet Assay gibi metodları içerebilecek benzer çalışmalarda canlılarda genotoksik etki gösterip göstermediğinin anlaşılabileceği***" belirtilmiş olup,

Bu tez çalışmasında da, birden fazla fonksiyonu olan gıda katkı maddeleri sınıfında yer alan ve renk sabitleyici (renk tutma ajanı), boyama, asit düzenleyicisi veya demir takviyesi için kullanılan ferrolaktat' ın (0.005, 0.015, 0.025 (g/ml)) genotoksisite ve antigenotoksisite çalışmalarında en çok tercih edilen model organizmalardan *Drosophila melanogaster*' deki genotoksik etkisi; heterozigotluğun kaybının tanınması ile geliştirilmiş, tek bir kuşakta sonuç alınabilen, hedef genleri kolay tespit edilebilen, nokta mutasyon, delesyon ve somatik rekombinasyonların tespit edilebildiği, hızlı, ekonomik ve güvenilirliği kanıtlanmış in vivo bir test sistemi olan [52] somatik mutasyon ve rekombinasyon testi (SMART) ve 1988 yılında Singh ve ark. [62] tarafından geliştirilen *"tek sarmal kırıkları"* denilen ve sadece alkali ortamda ortaya çıkan DNA tek sarmal kırıklarının tanımlanmasına imkan sağlayan günümüzde de uygulanan comet assay yöntemiyle araştırılmıştır.

Çalışmada negatif kontrol grubu olarak besiyerlerde distile su kullanılırken, pozitif kotrol grubu olarak Kaya (2003) [123], Demir ve ark. (2009) [124], (2010b) [125] D*rosophila melanogaster*' de daha önceki çalışmalarında DNA' nın yapısına direkt olarak etki ettiği tespit edilen ve nokta mutasyon delesyon ve kromozom kırıkları ile rekombinasyona neden olduğu, genotoksik etki gösterdiği tespit edilen Etil Metan Sülfonat (EMS) kullanılmıştır.

Ferrolaktat' ın yapısında demir minerali bulunmaktadır. Demir, oksijeninin organizmadaki dolaşımı için hayati öneme sahip ve çok eski zamanlardan buyana ilaç olarak ta kullanılabilen bir mineraldir. Yetişkin bir insan vücudunda bulunan ortalama demir miktarı 3-4 g, atlarda 20 g, koyun ve köpeklerde 1 g' dır. Demir mineralinin büyük bir kısmı besin maddeleri vasıtası ile alınır [31,32].

Demir yoğun olarak kuru fasülye, ciğer, et, yulaf, kakao, midye, fındık, ceviz ve koyu yeşil yapraklı sebzelerde bulunmakta olup, günlük olarak yediğimiz besinlerden içeriğinde bulunan doğal demir mineralini vücudumuza alırız. Örneğin 60 g kurubaklagilde 4.2 mg, 50 g yumurtada 1.4 mg, 35 gr karaciğerde 3.0 mg, 50 g kuru kayısıda 1.1 mg, 150 g ekmekte 2.0 mg demir minerali bulunur. Yediğimiz gıdalardaki demirin ortalama % 10 kadarı vücudumuz tarafından emilirken ette bu oran % 35' e kadar çıkmaktadır. Etin diğer demir içeren besinlerle alınması durumunda vücut tarafından bitkisel demirin emiliminin arttığı bilinmektedir. Organizmanın demir gereksinimi yaşa ve kişiye göre değişmekle beraber yetişkin bir insanın demir gereksinimi günlük olarak vücuttan atılan miktar olan ortalama 0,9 mg' dır. Hamilelik veya gelişimsel dönemlerde vücuda demir takviyesi yapmak gerekebilir [32].

Sağlıklı bir yaşam sürmek adına katkı maddelerinin günlük alım miktarlarına dikkat ederek bu şekilde beslenmek isteyen bir kişi, tüketilecek katkı maddesinin temelini oluşturan mineral maddenin günlük yediğimiz besinlerdeki miktarlarını da göz önünde bulundurmalıdır.

Normal şartlarda kanın ihtiva ettiği demir miktarı % 0,005 kadardır. Bu miktar % 0,002 ye düştüğü takdirde anemi (kansızlık) meydana gelir. Bu sebeple demirin vücuda alınması gereklidir [31].

Demir yetersizliğinde, demir eksikliği anemisi, nefes darlığı, sarılık, kronik baş ağrısı, uyku düzensizliği, aşırı yorgunluk, tırnak kırılmaları, saç dökülmesi görülebilir.

Demirin fazlası da vücuttan atılamadığından mide kramplarına, karaciğer

sirozuna, bazı hormonal bozukluklara, baş dönmesine, kusmaya, bazı zamanlarda komaya sokmaya kadar gidebilir [32].

Toksik ve karsinojenik olduğu tespit edilen gıda katkı maddelerinin kullanımı yasaklanmıştır. Kullanımına izin verilen çeşitli gıda katkı maddelerinin de bazı kişilerde alerjik reaksiyonlar, deri döküntüleri, astım ve kanser oluşumuna neden olduğuna ilişkin çeşitli tartışmalar bulunmakta olup, katkı maddelerine karşı duyarlılık nedeniyle Norveç ve İsveç' te besinlerde renklendirici kullanımını tamamen yasaklamıştır [24]. Özellikle çocuklar katkı maddelerinin en çok da suni renklendiricili gıdaların potansiyel tüketicileri olarak risk altındadırlar [25].

Konsensus Kalkınma Paneli Ulusal Sağlık Enstitüsünün 1982 yılında yapmış olduğu çalışmada, katkı maddelerinin veya renklendiricilerin çocuklarda hiperaktiviteye neden olduğu iddiasını destekleyecek bilimsel kanıta ulaşamamış ancak, katkı maddelerinin veya renklendirici içeren besinleri tüketen dikkat eksikliği, hiperaktivite bozukluğu olan bazı çocuklarda diyet yöntemiyle bazı düzelmelerin ve davranış değişikliklerinin gözlendiği tespit edilmiştir [126].

Yakın zamanda, Amerika Birleşik Devletlerinde süt inekleri ile yapılan bir çalışmada, ferrolaktat'ın bazı besin maddelerindeki fosfor vb. diğer besin maddelerinin barsaktan emilimini etkileyip etkilemediğini araştırılmıştır. Çalışma sonucunda ferrolaktat' ın bu besin maddelerinin emilimini etkilemediği ancak, azot emilimi ile ferrolakatat' ın artan miktarı arasında negatif bir ilişki olduğu saptanmıştır [127]. Yine literatürde mide ve bağırsak ülserlerinin de aşırı demir ile ilgili olabileceğinden bahsedilmektedir. Bunlardan başka en önemlisi deney fareleri ile yapılan çalışmalarda aşırı demirin kanser ile ilişkisi olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır [128].

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, insan hastalıklarında *Drosophila melanogaster*' in model organizma olarak kullanılmasını desteklemektedir. Sinek proteinlerinin yarısı memeli proteinleri ile dizilim benzerliği göstermektedir. *Drosophila* genom dizi analizi, insan hastalıklarında belirlenen genlerin % 60' ından fazlasının *Drosophila* ortoloğu olduğunu göstermiştir. Böylelikle; insan hastalıklarında mutasyon, amplifikasyon veya delesyon ile değişime uğrayan 287 civarında gen *Drosophila* ortoloğudur. *Drosophila* ve insan hücre döngülerinin ve düzenleyici yollarının benzerliği tümörgenezis esnasında çoğalma süreci çalışmalarında bir model olarak hizmet eder [129].

Drosophila imajinal disklerinin biyolojik özellikleri, kansere hassas birçok memeli hücresi ile benzerdir. İmajinal diskler ergin sineklerde birçok yapıyı oluşturan özelleşmiş epitel hücre keseleridir. Bu diskler tek hücre tabakası yapısındadır. Larval evrede çoğalarak karakteristik morfolojiye sahip olgun diskleri üretirler ve ergin bireylerde farklılaşırlar. Çoğalmaya ve farklılaşmaya giden özelleşmiş epitel hücreleri diploittir ve memeli hücrelerindekine benzer hücre döngüsüne sahiptirler (G1, S, G2 ve M safhalarını içerirler) [129].

Drosophila, biyoaktivasyondan sorumlu enzim sistemleri memelilerinkine benzeyen bir organizma olduğu için çeşitli kimyasalların yanı sıra bu kimyasalların parçalanma ürünlerinin mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılmasında da elverişlidir [130]. Kullanılan özel genetik hatlar sayesinde kimyasalın sadece mutajenik etkisi değil aynı zamanda rekombinojenik etkisi hakkında da bilgi sahibi olunabilmektedir [131,132,133]

Ayrıca meyve sineği *Drosophila melanogaster* çeşitli bileşiklerin antigenotoksik etkilerinin de çalışıldığı önemli bir model organizmadır. Somatik mutasyon ve rekombinasyon testinin genotoksisiteyi geniş bir spektrumda (nokta mutasyon, delesyon, kromozomlarda ayrılmama, rekombinasyon) incelemesi nedeniyle, tek bir bileşiğin veya karışımların antigenotoksisitenin çalışıldığı birçok çalışma bulunmaktadır [122,134,135,136,137,138].

Comet assay testi, son zamanlarda *Drosophila melanogaster*' in larvalarından izole edilen kan hücrelerinde (hemositler) çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanların indüklediği DNA hasarını tespit etmede yaygın olarak kullanılmaktadır [99,100,101,102,103,104,121]. **Hemolenfdeki hemositler memelilerin kanlarındaki lenfositlere benzer işlevlere sahip kan hücrelerdir** [69]. Hemositler toksik bileşiklere doğrudan maruz kalabilmektedir. Bu nedenle, genotoksisite değerlendirmelerinde kullanılan ilginç hedef doku hücreleridir [99].

Çalışmada; 72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster* transheterezigot larvaların ferrolaktat' lı (0.005, 0.015, 0.025 (g/ml)) besiyerlere maruz bırakılması ve erginlerin kanatlarında meydana gelen mutasyonların kanat Somatik Rekombinasyon ve Mutasyon Testi (SMART) sonucunda elde edilen veriler ile;

72 ± 4 saatlik *Drosophila melanogaster* Oregon R+ genetik soyundan larvaların 24 saat ferrolaktat' lı (0.005, 0.015, 0.025 (g/ml)) besiyerlere maruz bırakılması ve 96 ± 4 saatlik larvaların hemositlerinin izole edilerek Comet assay yöntemiyle DNA kırıklarının tespit edilmesi uygulaması sonuçları aşağıda birlikte değerlendirilmiş olup, Larvaların;

0.005 (g/ml)' lik Ferrolaktat' lı besiyere maruz bırakılma neticesinde;

SMART testi sonucuna göre, kontrol grubu ile istatistiksel anlamda önemsiz bir fark oluştuğu, ancak kontrol grubuna göre tüm klon tiplerinin ve kanat başına düşen klon sayısının az da olsa artttığı,

Comet Assay testi sonucuna göre, kontrol grubu ile istatistiksel anlamda fark oluşmadığı, ancak kontrol grubuna göre DNA' daki kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (μm) ve kuyruk uzunluğu (μm) ortalamalarında azda olsa bir artış olduğu tespit edilmiştir.

0.015 (g/ml)' lik Ferrolaktat' lı besiyere maruz bırakılma neticesinde;

SMART testi sonucuna göre, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı/önemli (+) bir fark oluştuğu, kontrol grubu ve 0.005 (g/ml)' lik ferrolaktat derişimi uygulaması sonuçlarına göre tüm klon tiplerinin ve kanat başına düşen klon sayısında artış gözlendiği,

Comet assay testi sonucuna göre, 0.015 (g/ml)' lik ferrolaktat derişimi sonuçları ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamda fark oluşmadığı ancak, kontrol grubu ve 0.005 (g/ml)' lik ferrolaktat derişimine göre DNA' daki kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (μm) ve kuyruk uzunluğu (μm) ortalamalarında belirgin bir artış olduğu ve **neredeyse** istatistiksel olarak anlamlı sayılabilecek bir sonuç tespit edilmiştir.

0.025 (g/ml)' lik Ferrolaktat' lı besiyere maruz bırakılma neticesinde;

SMART testi sonucuna göre, kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı/önemli (+) bir fark oluştuğu, ayrıca kontrol grubu, 0.005 (g/ml)' lik ve 0.015 (g/ml)' lik ferrolaktat derişimine göre tüm klon tiplerinin ve kanat başına düşen klon sayısının arttığı, ancak ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişimi ile 0.025 (g/ml)' lik ferrolaktat derişimlerinin uygulanması sonucunda elde edilen klon tiplerinin ve kanat

başına düşen klon sayılarındaki artışın 0.005 (g/ml)' lik derişimi ile 0.015 (g/ml)' lik ferrolaktat derişimi arasındaki artıştan daha az olduğu;

Comet assay testi sonucuna göre, ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml)' lik derişimi sonuçları ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamda fark oluştuğu; kontrol grubu ve ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişimine göre DNA' daki kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamalarında belirgin bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişimi ile ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml)' lik derişimlerinin uygulanması sonucunda elde edilen DNA' daki kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamalarındaki artışın ferrolaktat' ın 0.005 (g/ml)' lik derişimi ile 0.015 (g/ml)' lik derişimi arasındaki artıştan çok daha az olduğu tespit edilmiştir.

Gerek SMART testi gerekse Comet Assay testi sonucunda ferrolaktat' ın **artan dozlarında** elde edilen verilerde istatistiksel anlamda bir artış gözlendiği; SMART testi sonucuna göre tüm klon tiplerinin ve kanat başına düşen klon sayısının atış gösterdiği, 0.005 (g/ml)' lik derişiminin istatistiksel anlamda önemsiz bir fark oluşturduğu ancak ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik ve 0.005 (g/ml)' lik derişiminin istatistiksel anlamda pozitif bir fark oluşturduğu ve genotoksik riske neden olduğu anlaşılmış. Comet assay testi sonucuna göre de ferrolaktat' ın artan dozlarında DNA' daki kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamalarında bir artış gözlendiği, 0.005 (g/ml)' lik derişimin istatistiksel anlamda anlamlı olmadığı, ferrolaktat' ın 0.015 (g/ml)' lik derişimin de DNA' daki kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamalarında belirgin bir şekilde artış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, ferrolaktat' ın 0.025 (g/ml)' lik derişiminin istatistiksel anlamda pozitif bir fark oluşturduğu ve genotoksik etkiye neden olduğu anlaşılmıştır (Tablo 4.1. ve Tablo 4.2.).

Her iki test sisteminde de grafiklerde görüleceği üzere doz artışlarındaki oranlarda SMART testi sonucunda transheterezigot *Drosophila melanogaster* ergin kanatlarında meydana gelen küçük tekli klon, büyük tekli klon, ikiz klon, toplam klon ve kanat başına düşen mutant klon sayısında ve Drosophila hemositlerde ki DNA' daki hasarın, kuyruk yoğunluğu (%), kuyruk momenti (µm) ve kuyruk uzunluğu (µm) ortalamasının benzer oranlarda artış gösterdiği test sonuçlarının birbirlerini destekler nitelikte olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6., Şekil 4.7).

Yapılan çalışma sonucunda da ferrolaktat' ın çeşitli konsantrasyonlarınının *Drosophila melanogaster* üzerinde genotoksik risk göstermesi ve *Drosophila* biyolojisi ile insan biyolojisinin benzerliğide dikkate alınarak gıda katkı maddesi ferrolaktat' ın tüketimine dikkat edilmesi gerektiği sonucu ortaya koymuştur. Her ne kadar gıda katkı maddesi ferrolaktat' ın genotoksik risk etkisi tespit edilmiş olsa da benzer çalışmaların gerek ferrolaktat gerekse diğer gıda katkı maddelerinin değişik model organizma ve değişik test sistemleri ile test edilmesine ihtiyaç vardır.

Sonuçta; gıda katkı maddelerinin kullanımının insan sağlığını korumak üzerine inşa edilmesi gerekliliği ile birlikte, gerek hızlı kentleşme, gerekse insanların çalışma şartları ve alışkanlıklar insanları besinlere çeşitli nedenlerle ilave edilen gıda katkı maddelerinin bulunduğu hazır besinlerin tüketilmesine yöneltmiştir. Hazır besinlerin büyük bir çoğunluğunda çeşitli gıda katkı maddeleri bulunmaktadır. İnsanlar tüketmekte oldukları hazır besinlerin içerisinde bulunan gıda katkı maddelerinin neler olduğunu hangi miktarlarda kullanılması gerektiğini bilmeden yada hazır besinlerin çeşitli güvenlik testlerinden geçirilerek ve sürekli olarak denetlendiğini düşünerek bilinçli veya bilinçsiz olarak tüketmektedirler.

Bu tüketimin küçük ölçekte insanları, büyük ölçekte toplumu ve gelecek nesillerimizi etkileyebilecek büyük sağlık sorunları oluşturmadan önce bazı kurum/kuruluşlara, üreticilere ve tüketicilere çeşitli sorumluluklar düşmektedir.

Gıda katkı maddelerinin kullanımı konusunda denetimlerde bulunan kurum ve kuruluşlara bazı görevler düşmektedir. Bunlar;

Gıda üreticilerine gıda katkı maddelerinin kullanımı ve standartizasyonu konusunda eğitimler verilmesi, gıda katkı maddelerinin kullanım miktarlarının test edilmesi konusunda çalışmaların yapılması, gıda katkı maddelerinin hangi miktarlarda ve şartlarda kullanıldığının denetlemesi, gerekli mevzuatın tam anlamıyla uygulanması, yapılacak denetimlerde gıda katkı maddelerinin usulüne uygun kullanılmadığının tespit edilmesi halinde toplum sağlığını etkileyeceğinden ağır yaptırımların uygulanarak caydırıcılığın sağlanması ayrıca, bu üretici kurum/kuruluş/şirketlerin teşhir edilmesi, ürettikleri besinlerde katkı maddelerini usulüne uygun olarak kullanıldığı tespit edilen üretici kurum/kuruluş/şirketlerin desteklenmesi vb.

Katkı maddeleri konusunda Akademik kurumlara/birimlere de bazı görevler düşmektedir. Bunlar; insanların gıda katkı maddelerine olan farkındalığını arttırıcı ve bilinçli bir tüketici olmalarını sağlayıcı panel, münazara vb. etkinlikler düzenlenmesi, öğrencilere gıda katkı maddeleri konusunda dersler okutulması, gıda katkı maddeleri ile ilgili yapılacak akademik çalışmalara destek verilmesi vb.

Bir diğer kuruluş olan yazılı ve görsel medya da insan sağlığını ilgilendiren konularda izleyici kitlesini bilinçlendirici haber ve program sayısını arttırabilir.

Yapmış olduğumuz çalışmalarda ferrolaktat' ın çok küçük oranlardaki artışının bile genotoksik etki artışına neden olabildiği tespit edildiğinden, üreticilerin ticari fayda kaygısı gütmeden hazır besinlerde kullanılması gereken oranları aşmaması ve gerekli standardizasyonu sağlayarak bu bilinçle üretim yapması gerekmektedir.

Hazır besin tüketicileri ise, gıda katkı maddelerinin insan sağlığına olumsuz yönde etki edebileceğini ve kullanım miktarlarının aşılmaması gerektiği bilinci ile hareket etmelidir.

Yapmış olduğumuz çalışma ile ilgili SMART testi uygulaması sonuçlarına göre besinlerde gıda katkı maddesi olarak kullanılan ferrolaktat' ın artan doza bağlı olarak DNA' nın yapısına etki ederek mutant klon sayısında artışa, nokta mutasyon, delesyon ve somatik rekombinasyona sebep olduğu; Comet Assay testi uygulaması sonuçlarına göre de ferrolaktat' ın artan dozlarda tek iplik DNA hasarına neden olduğu ve genotoksik risk oluşturabileceği tespit edilmiştir.

Temelinde toplum sağlığını ilgilendiren bu tez çalışması analiz edildiğinde, insan sağlığına hizmet edecek bir çalışma olduğu ve benzer çalışmalara fikir verme anlamında katkı sağlayacağı, ayrıca ferrolaktat' ın ve diğer gıda katkı maddelerinin alınması gereken miktarlarının üzerinde alınması halinde genotoksik riskler doğurabileceği, gelecek nesillerin sağlıklı bir yaşam sürmesi için gıda katkı maddelerinin uygun miktarda tüketilmesinin önem arzedeceği değerlendirilmekte olup; ek olarak uygulamada kullanılan SMART testi ile *Drosophila* hemositlerinde Comet Assay testi sonucunda ferrolaktat' ın genotoksitite sonuçlarının benzer/paralel sonuçlar göstermesi, mutajen olduğu bilinen maddelerin Etil Metan Sülfonat (EMS) uygulanmasında genotoksik etki tespit edilmiş olması *Drosophila* hemositlerinin Comet Assay test sisteminde hedef hücre olarak kullanılabileceği sonucunu da ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

[1] G. R. Hoffman, ***Casaret and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons***, Pergamon Pres, New York, pp. 201-217, (1991).

[2] B. Tras, ***Genetik Toksikoloji***, Median Yayınevi, Ankara,I. Baskı, s. 443-470, (1998).

[3] H. Maki, ***Origins of spontenous mutations: specifity and directionalityofbase substition, frameshift, and sequens-substition mutagenes***, Annual Review of Genetics, 36, 279-303, (2002).

[4] W. S. Klug and M. R. Cummıngs, ***Genetik Kavramlar***, PalmeYayıncılık, Ankara, s.816, (2002).

[5] A. J. Grifits, J. H. Miller, D. T. Suzuki, R. C. Lewantin and W. M.Gelbart, ***An introduction togenetic analysis***. Seventh Edition, New York, pp.860, (2000).

[6] H. V. Mallıng, ***Incorporation of mammalian metabolism intomutagenicity testing***, Mut. Res. 566: 183-189, (2004).

[7] C. A. Smith and E. J. Wood, ***Molecular Biology and Biotechnology***, Firstedition, Chapman and Hall Limited, London, (1991).

[8] L. S. Ripley, ***Frameshift mutation: Determinants of specificity***, Annu. Rev. Genet. 24: 189-213, (1990).

[9] A. T. Natarajan and G. Obe, ***How do in vivo mammalian assayscompare to in vitro assays in their ability to detect mutagens***. Mut. Res. 167: 189-201, (1986).

[10] S. Venitt and D. H. Phillips, ***The importance of environmentalmutagens in human carcinogenesis and germline mutation***. In Phillips, D. H. and S.Venitt, Environmental Mutagenesis, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1-20, (1995).

[11] B. W.Glickman, G. Kotturi, J. Boer and W. Kusser, ***Molecular mechanisms of mutagenesis and mutational spectra***, In Phillips, D. H. Ands. Venitt, Environmental Mutagenesis, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, 1-33, (1995).

[12] L. J. Marnett and J. P. Plastaras, ***Endogenous DNA damage and Mutation***, Trends in Genetics, 17, pp. 214-221, (2001).

[13] N. Vural, ***Besin Analizleri***, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Yayın No: 69: s. 142-144, (1992).

[14] M. Miller, ***Danger Additives At Work***, London Food Commission, London, (1985).

[15] Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, T.C. Resmi Gazete, Sayı: 23172, (1997).

[16] T. Altuğ, ***Gıda Katkı Maddeleri***, Meta Basım, İzmir, s. 286, (2001).

[17] İ. Özkaya, ***Gıda katkı maddeleri ve toksinler***, Sağlıkta ve hastalıkta beslenme sempozyumu dizisi, 41: 39-44, (2004).

[18] S. Öztürk, F. Erel, A. Z. Çalışkaner, M. Karaayvaz, M. Güleç, Ö.Kartal, ***Kronik İdiopatik Ürtikerde Katkı Maddeli Gıdalar ile Doğal Gıdalarda Bulunan Vazoaktif Maddelerin Rolü***, Koruyucu Hekimlik Bülteni 6-(5), 351-356, (2007).

[19] M. Yurttagül, S. Yücecan, A. Ayaz, ***Öğrencilerin Dörtte Biri E-Kodlu Ürün Almıyor,*** Ankara, ***(2009),*** http://www.gidacilar.net/gida-katki-maddeleri/ ogrencilerin - dortte-biri-e-kodlu-urunu-almiyor-1734.html, (erişim: 02/01/2014).

[20] G. Mermer, ***Gıda Katkı Maddeleri,*** Ege Üni. Halk Sağlığı ABD, (2007), http://www.halksagligi.med.ege.edu.tr/seminerler/2006-07/Gida_Katki_ Maddeleri_ GM. pdf (erişim:14/01/2014).

[21] T. E. Tuormaa, ***The Adverse Effects Of Food Additives On Health***, A Review Of The Literature With Special Emphasis On Childhood Hyperactivity, Journal Of Orthomolecular Medicine 9: 225–243, (1994).

[22] D. Boyacıoğlu, ***Gıda Katkı Maddeleri Nedir,*** İTÜ Gıda Müh. Bölümü, Derleme, (2003).

[23] H. Özdemir, A.B.Turhan, H. Arıkoğlu, ***Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitrit'in Genotoksik Etkilerinin Araştırılması***, European Journal Of Basic Medical Science, (2012).

[24] E. Z. Çalışır, D. Çalışkan, ***Gıda Katkı Maddeleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri***, Ankara Ecz. Fak. Derg. 32 (3): 207-206, (2003).

[25] A. Karaali, ***Gıda Katkı Maddeleri ile İlgili Yasal Düzenlemeler***, İTÜ Gıda Mühendisliği Bölümü, (2006), http://www.gidakat. org.tr/images/artemis_ karaali.pdf, (erişim:09/01/2014).

[26] D. R. Briggs, ***Food Additivis***, Wahlgvist ML(Ed). Food and Nutrition, Allen& Unwin Pty. Ltd., Australia, (1997).

[27] M. Yurttagül, A. Ayaz, ***Katkı Maddeleri*** **Yanlışlar ve Doğrular**, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara. Klas Matbaacılık, Ankara, (2008).

[28] CodexAlimentariusAmnex, ***Ferrous Lactate,*** (2011), www.**codexalimentarius**. org /.../al8912be.pdf, (erişim:05/01/2014).

[29] U. S. Food and drug administration, (FDA), ***Ferrous Lactate,*** (2013), http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=184.1311, (erişim:07/01/2014).

[30] FAO, ***Gıdalar ve İlaçlar***, (2003), http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/specs/Monograph1/Additive-193.pdf, (erişim:16/01/2014).

[31] N. M. Öktel, ***Farmakoloji***, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Yayın No:4, Güzel İstanbul Matbaası, 1: s. 148-151, (1964).

[32] M. Tayar ve R. Çıbık, ***Gıda Kimyası***, Dora Basım Yayınevi, 2, s. 34-46, (2011).

[33] ***Ferrolaktat,*** http://www.hammaddeler.com/index.php?option=com_ content&view=article&id=5720&Itemid=443, (erişim:28/11/2012).

[34] MEGEP Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi, ***Gıda Teknolojisi, Sofralık Zeytin Çeşitleri***, Ankara, (2009).

[35] S. W. Klug, M. R. Cummings, ve A. C. Spencer, ***Genetik Kavramlar***, Palme Yayıncılık, (2004).

[36] U. Graf, S.N. Van, F.E. Würgler, ***Drosophila Genetics***, A Pratical course, Springer-Verlag Press, 0 387 57327 9, New York, pp. 236, (1992).

[37] Y. Doğan, ***Model Organizmalar***, http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_model.pdf, (erişim: 28/12/2013).

[38] L. Özata, ***Bazı tekstil boyalarının Drosophila melanogasterüzerinde toksik ve genotoksik etkilerinin araştırılması***, İnönü Üniversitesi, Doktora Tezi, (2006).

[39] S. Yurtsever ve G. Olgun, ***Genetik Laboratuar Klavuzu***, Trakya Ünv. Rektörlüğü Yayınları, No:56, (2003).

[40] M. Ashburner, ***Drosophila a laboratory handbook***, Cold Spring Harbor Press, 0 87969 321 8, New York, pp. 689, (1989).

[41] B. Falakalı, ***Drosophila Genetiği***, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları No:134, İzmir, s. 1-10, (1989).

[42] G. M. Rubin and E. B. Lewis, ***A brief history of Drosophila's contributions to genome research***, science, 287, 2216-2217, (2000).

[43] E.E. Doğan, ***Bazı Astrozon Grubu Tekstil Boyalarının Genotoksik Etkisinin Drosophilamelanogaster Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi (SMART) İle Araştırılması***, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi, (2002).

[44] A. N. Bozcuk, **Genetik**, Palme Yayıncılık, Ankara, s. 269, (2000).

[45] J. Wixon and C. O'kane, ***Featured organism, Drosophila melanıgaster***, Yeast, 17 (2): pp. 146-153, (2000).

[46] U. Graf, and N. Vanschaik, ***Improved highbioactivation cross for the wingsomatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster,*** Mutation Research, 271: 59-67, (1992).

[47] U. Graf And F.E. Würgler, ***The present status of validatıon of the wing spot test in Drosophila***, Genetic Toxicology of Environmental Chemicals, Part B: Genetic Efect and Applied Mutagenesis, pp. 391-398, (1986).

[48] U. Graf, H. Frei, A. Kagi, A.J. Katz and F.E. Würgler, ***Thirty compounds tested in the Drosophila wing spot test***, Mutation Research, 222: 359-373, (1988).

[49] S. Zimmering, M.P. Cruces, E.Pimentel, C.Arceo, G. Carrosco, O. Olvera, ***On the recovery of single spots with the flr phenotype in the wing spot test in Drosophila***, Mutation Research, 379: 77-82, (1997).

[50] U. Graf, and F. E. Würgler, ***The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster***, Environ, Mol. Mutagen, 27: 219-226, (1996).

[51] F. E. Würgler, and E. W. Vogel, ***In vivo mutagenicity testing using somatic cells of Drosophila melanogaster.*** In chemical mutagens, Principle and medhods for their detection, Plenum Pres, Vol. 10, New York, pp. 1-73, (1986).

[52] U. Graf, F. E. Wrügler, A. J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall and P.G. Kale, ***Somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster***, Envirronmental Mutagenesis, 6: 153-188, (1984).

[53] J. G. Rincon ve U. Graf, ***Drosophila melanogaster somatic mutation andrecombination test as a biomonitor***, Plenum Press, New York, pp. 169-179, (1995).

[54] B. Kaya, ***Bazı pestisitlerin Drosophila melanogaster hatlarında mutajenik ve rekombinojenik etkilerinin araştırılması,*** Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, (2000).

[55] J. Szabad, I. Soos, G. Polgar and G. Hejja, ***Testing themutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the Drosophila mozaik and thesex linked recessive letal test***, Mut. Res.,113: 117-133, (1983).

[56] D. S. Henderson, ***Drosophila Cytogenetics Protocols***, Humana Press İnc., 247, Totowa, 395-396, (1998).

[57] R. Sarıkaya, Ş. Çakır, ***Genotoxicity testing of four food preservatives and theircombination in the Drosophila melanogaster***, Environmental Toxicology and Pharmocology, 20: 424-430, (2005).

[58] T. Watanabe, T. Kasai, M. Arima, K. Okumura, N. Kawabe and T. Hirayama, ***Genotixicity in vivo of phenazine and aminophenazines assayed in the wing spot test andthe DNA-repair test with Drosophila melanogaster***, Mutation Research/GeneticToxicology, 369: 75-80, (1996).

[59] Ş. Çakır, R. Sarıkaya, ***Genotoxicity testing of some organophosphate insecticides inthe Drosophila wing spot test***, Food and Chemical Toxicology, 43: 443-450, (2005).

[60] D. W. Fairbain, P. L. Olive, K. L. O'Neill, ***The Comet Assay***, A Comprehensive Reviev, Muation Research, 339: 37-59, (1995).

[61] O. Ostling, K.J. Johanson, ***Microelectrophoretic Study Of Radiation İnduced DNA Damage In Individual Mammalian Cells***, Biochemical And Biophysical Research Communications,123: pp. 291–298, (1984).

[62] N. P. Singh, M. T. Mc Coy, R. R. Tice and E. L. Schneider, ***A simple technique forquantitation of low levels of DNA damage in individual cells***, Exp. Cell Res., 175: 184-191, (1988).

[63] N. P. Singh, D. E. Danner, R. R. Tice, L. Brant, E. L. Schneider, ***Singlecell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in humanbiology"*** Mutat. Res., 37: 123, (1990).

[64] S. Şardaş, ***Microgel Electrophoresis Assay (Comet Test) for Detecting DNA Damagein Individual Cells***, J. Fac. Pharm. Gazi, 13: s. 65-73, (1996).

[65] M. Klaude, S. Ericson, J. Nygren, G. Ahnstrom, ***The Comet Assay Mechanisms and Techical Considerations***, Mutation Research, 363: 89-96, (1996).

[66] M. Dikilitaş ve A. Koçyiğit, Canlılarda "***Tek Hücre Jel Elektroforez" Yöntemi İle DNA Hasar Analizi, Comet Analiz Yöntemi***, HR.Ü.Z.F. Dergisi, 14 (2); 77-89, (2010).

[67] E. Rojas, M. C. Lopez and M. Valverde, ***Single Cell Gel Electrohopresis Assay: Methodology And Applications***, Journal of Chromatography B., 722: pp.225-254, (1999).

[68] A. Koçyigit, H. Keles, S. Selek, S. Güzel, H. Çelik, O. Erel, ***Increased DNA damage and oxidative stress in patients withcutaneous leishmaniasis Mutation***, Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 585, Issues 1-2: 71-78, (2005).

[69] P. Irving, J. M. Ubeda, D. Doucet, L. Troxler, M. Lagueux, D. Zachary, J.A. Hoffmann, C. Hetru, M. Meister, ***New insights into Drosophila larval haemocyte functions through genome-wide analysis***, Cell Microbiol, 7: pp. 335-350, (2005).

[70] M. H. Green, J. E. Lowe, C. A. Delaney, I. C. Green, ***Comet assay to detect nitric oxide-dependent DNA damagein mammalian cells,*** Methods Enzymol, 269: pp. 243-66, (1996).

[71] Y. Dinçer, S. Kankaya, ***DNA Hasarının belirlenmesinde Comet Assay***, Türkiye Klinikleri J. Med. Sci, Derleme, 30 (4):13, 65-73, (2010).

[72] A. R. Collins, ***The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations***, Molecular Biotechnology Vol.(26): 249-261, (2004).

[73] V. J. McKelvey-Martin, M. H. Green, P. Schmezer, B. L. Pool-Zobel, M. P. De Méo, A. Collins, ***The single cell gelelectrophoresis assay (comet assay)***: A European review. Mutat Res. 288 (1): 47-63, (1993).

[74] T. Gichner, A. Mukherjee ve J. Veleminsky, ***DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay withtobacco plants after treatment with ethylmethanesulphonate, hyperthermia and DNase-I***, Mutation Research, 605: 17-21, (2006).

[75] V. Fidancı, ***Elektroforez Uygulamaları ve Klinik Laboratuvar***, (2010), 80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/**fidanci**/.../**Elektroforez**_2010.pdf, (erişim: 21/01/2014).

[76] A. A. Başaran, ***Farmakognozide Tek Hücre Jel Elektroforezi Uygulamaları***, Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir, ISBN 975-94077-2-8, (2002).

[77] D. Anderson, A. Dhawan, T. Wei, and M.J. Plewa, ***An investigation of bonemarrow and testcular cells invivo using the comet assay***, Mutat. Res., 370: 159-174, (1996).

[78] R. D. Bowden, M. R. Buckwalter, J. F. McBride, D. A. Johnson, B. K. Murray, and K. L. O'Neill, ***Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay***, Mutat. Res., 537: 1-9, (2003).

[79] B. Hellman, H. Vaghef and B. Bostrom, ***The concepts of tail moment and tailinertia in the single cell gel electrophoresis assay***, Mutat. Res., 336: 123-13, (1995).

[80] S. Cotella and J. F. Férard, ***Comet assay in genetic ecotoxicology***, A review. Environmental and Moleculer Mutagenesis, 34: 246-255, (1999).

[81] M. Vrzoc, M. Petras, ***Comparison of DNA Damage in Peripheral Blood and pleen Lymphocytes Using the Single-Cell Gel Assay***, Mutation Research, 379: 263-269, (1997).

[82] P. Vajpayee, A. Dhawan ve R. Shanker, ***Evaluation of the alkaline comet assayconducted with the wetlands plant Bacopamonnieri L. as a model for ecogenotoxicity assessment,*** Environmental and Molecular Mutagenesis 47: 483-489, (2006).

[83] T. Gichner, I. Znidar, E.D. Wagner ve M.J. Plewa, ***The use of higher plants in thecomet assay. In: The Comet Assay in Toxicology***, Edited by Alok Dhawan and Diana Anderson, Royal Society of Chemistry, pp. 98-119, (2009).

[84] J. Rank, K.Syberg ve K. Jensen, ***Comet assay on tetraploid yeast cells***, Mutation Research 673: 53-58, (2009).

[85] L. Forchhammer, E.V. Bräuner, J.K. Folkmann, P.H. Danielsen, C. Nielsen, A. Jensen, ***Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the cometassay with visual scoring,*** Mutagenesis 23 (3):2, pp. 23-31, (2008).

[86] C. Betti, T. Davini, L. Gianessi, N. Loprieno, R. Barale, ***Microgel Electrophoresis Assay (Comet Test) and SCE Analysis in Human Lymphocytes from 100 Normal Subjects***, Mutation Research, 307: 323-333, (1994).

[87] C. Betti, T. Davini, L. Gianessi, N. Loprieno, R. Barale, ***ComparativeStudies by Comet Test and SCE Analysis in Human Lymphocytes from 200 Healthy Subjects***, Mutation Research, 343: 201-207, (1995).

[88] G. Frenzilli, C.Betti, T. Davini, M. Desideri, E. Fornai, L. Giannessi, F. Maggiorelli, P. Paoletti, R. Barale, ***Evulation of DNA Damagein Leukocytes of ExSmokers by Single Cell Electrophoresis***, Mutation Research, 375: 117-123, (1997).

[89] M. Wojwodzka, M. Kruszewski, T. Iwanenko, A.R. Collins, I. Szumiel, ***Lack of Adverse Effect of Smoking Habit on DNA Strand Breakage and Base Damage***, ***as Revealed by the Alkaline Comet Assay***, Mutation Research, 440: 19-25, (1999).

[90] H. Cerda, H. Delincee, H. Haine, H. Rupp, ***The DNA Comet Assay as a Rapid Screening Technique to Control Irradiated Food.*** Mutation Research, 375: pp. 167-181, (1997).

[91] A. R. Collins, V.L.Dobson, M. Dusinska, G. Kennedy, R. Stetina, ***The Comet Assay What can it Really tell us***, Mutation Research, 375: 183-193, (1997).

[92] M. Kruzewski, M. Wojewodzka, T. Iwanenko, A.R. Collins, I. Szumiel, ***Application of the Comet Assay for Monitoring DNA Damage Workers Exposedto Chronic Low-Dose Irradiation II. Base Damage***, Mutation Research, 416: 37-57. (1998).

[93] M. H. L. Green, J.E. Lowe, A.P.W. Waugh, K.E. Aldridge, J. Cole, C.F. Arlett, ***Effect of Diet and Vitamin C on DNA Strand Breakage in Freshly-Isolated Human White Blood Cells***, Mutation Research, 316: 91-102, (1994).

[94] N. Türel, ***Gıda Katkı Maddesi Ferrolaktat' ın Drosophila melanogaster'in Yaşam Döngüsündeki Larva, Pupa ve Ergin Sayıları Üzerindeki Etkileri***, Yüksek lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, (2013).

[95] E. Demir, ***Ayçiçek ve Soya Yağlarının Kızartma ve Kaynatma ürünlerinin Drosophila melanogaster'de Genotoksik etkilerinin Araştırılması***, Doktora Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, (2011).

[96] F. Turna, ***Resveratrol'ün Drosophıla melanogaster'de antigenotoksik etkilerinin araştırılması***, Yüksek lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Antalya, (2012).

[97] H. Aşkın ve H. Uysal, ***Drosophila melanogaster'de Glısıteın ve Koumestrolün Genotoksik Etkilerinin Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Belirlenmesi***, TÜBAV Bilim 3(3), s. 264-270, (2010).

[98] V. S. Amaral, M. Sinigaglia, M.L. Reguly, H.H. Rodrigues de Andrade, ***Genetic Toxicity in surface water from Guaiba Hydrographic Region under the influence of industrial, urban and agriculyural sewage in the Drosphila Wing-Spot Test***, Environmental pollution, (2005).

[99] E. Demir, B. Kaya, ***Studies on the Genotoxic Properties of Four Benzyl Derivatives in the In vivo Comet Assay Using Haemocytes of Drosophila melanogaster***, Fresen Environ Bull, 22 (5): 1590-1596, (2013).

[100] E. R. Carmona, T. Guescheva, A. Creus, R. Marcos, ***Proposal of an in vivo Comet assay using haemocytes of Drosophila melanogaster***, Environ. Mol. Mutagen, 52: 165-169, (2011a).

[101] E. R. Carmona, A. Creus, R. Marcos, ***Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of Drosophila melanogaster***. Environ. Mol. Mutagen. 718: 33-37, (2011b).

[102] E. R. Carmona, A. Creus, R. Marcos, ***Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of Drosophila melanogaster***, Environ. Mol. Mutagen. 724: 35-40, (2011c).

[103] H. R. Siddique, D. K. Chowdhuri, D. K. Saxena, A. Dhawan, ***Validation of Drosophila melanogaster as an in vivo model for genotoxicity assessment using modified alkaline Comet assay***, Mutagenesis vol. 20 (4): 285-290, (2005).

[104] I. Mukhopadhyay, D. K. Chowdhuri, M. Bajpayee, A. Dhawan, ***Evaluation of in vivo genotoxicity of cypermethrin in Drosophila melanogaster using the alkaline Comet assay***, Mutagenesis vol. 19 (2), 85-90, (2004).

[105] I.M.C.M.M. Carvalho, A.A.C.M. Cavalcente, A. F. Dantas, D.L.A. Pereira, F.C.C. Rocha, T.J.A.S. Andrade and J.D. Silva, ***Genotoxicity of sodium metabisulfite in mouse tissues evaluated by the comet 101 assay and micronucleus test***, Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 720: 58-61, (2011).

[106] J. Blasiak, E. Gloc, K. Wozniak, A. Czechowska, ***Genotoxicity of acrylamide in human lymphocytes***, Chem. Biol. Interact. 149: pp. 137-149, (2004).

[107] P. Moller, M. Viscovich, J. Lykkesfeldt, S. Loft, A. Jensen, H.E. Poulsen, ***Vitamin C supplementation decreases oxidative DNA damage in mononuclear blood cells of smokers***, Eur. J. Nutr. 43: pp. 267-274, (2004).

[108] Y. T. Szeto, I. F. Benzie, A. R. Collins, S. W. Choi, C. Y. Cheng, C. M. Yow, M. M. Tse, ***A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies,*** Mutat. Res. 578: 371-381, (2005).

[109] A. Gurbay, B. Gonthier, N. Signorini-Allibe, L. Barret, A. Favier, F. Hincal, ***Cipro-floxacin-induced DNA damage in primary culture of rat astrocytes and protection,*** by Vitamin E. Neurotoxicology, 27: 6-10, (2006).

[110] S. Sardas, S. Izdes, E. Ozcagli, O. Kanbak, E. Kadioglu, ***The role of antioxidant supplementation in occupational exposure to waste anaesthetic gases***, Int. Arch. Occup. Environ Health 80: pp. 154-159, (2006).

[111] A. A. Velanganni, S. Dharaneedharan, P. Geraldine, C. Balasundram, ***Dietary supplementation of vitamin A, C and E prevents p-dimethylaminoazobenzene induced hepatic DNA damage in rats***, Indian J. Biochem. Biophys. 44: pp. 157-163, (2007).

[112] A. Tozan Beceren, G. Z. Omurtag, C. Yeğen, S. Şardaş, ***Kolorektal Kanser Tanısı Konmuş Olgularda ve Birinci Derece Yakınlarında DNA Hasarının Araştırılması***, MUSBED, 1 (3): s. 155-161, (2011).

[113] R. Sarıkaya, M. Selvi, N. Akkaya, M. Acar, F. Erkoç, ***Farklı Konsantrasyonlardaki Gıda Boyalarının Drosophila melanogaster (mwh x flr)'de Yaşama Yüzdesi Üzerine Etkisi***, SDÜ Fen Dergisi (E-Dergi), 5 (1): 38-46, (2010).

[114] H. Özdemir, A. B. Turhan, H. Arıkoğlu, ***Potasyum Sorbat, Sodyum Benzoat ve Sodyum Nitrit'in Genotoksik Etkilerinin Araştırılması***, Eur J. Basic Med Sci; 2 (2): 34-40, (2012).

[115] B. Kaya, A. Yanıkoğlu, A. Creus, R. Marcos, ***Genotoxicity testing of five herbicides in the Drosophila wing spot test***, Mutation Research, 465: 77-84, (2000).

[116] U. GRAF, ***Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots for the wing somatic mutation and recombination test in Drosophila melanogaster***, *Experimentia*, 51: 168-173, (1995).

[117] A. Garcia-Bellido, and J. R. Merriam, ***Parameters of the wings imaginal discdevelopment of Drosophila melanogaster***, Developmental Biology, 24: 61-87, (1971).

[118] H. FREI and F.E. Würgler, ***Statistical methods to decide whether mutagenic testdata from Drosophila assays indicate a positive, negative or inconclusive results***, Mutation Research, 203: 297-308, (1988).

[119] M. A. Kastenbaum, and K.O. Bowman, ***Tables for determining the statisticalsignificance of mutation frequencies***, Mutation Research, 9: 527-549, (1970).

[120] P. B. Selby and W.H. Olson, ***Methods and criteria for deciding whether spesificlocusmutation-rate data in mice indicate a positive, negative or inconclusive result***, Mutation Research, 203: 297-308, (1981).

[121] E. Demir, ***In vivo genotoxicity assessment of diflubenzuron and spinosad in Drosophila melanogaster with the comet assay using haemocytes and the SMART assay***, Fresen Environ Bull, 21 (12): 3894-3900, (2012).

[122] E. Demir, F. Turna, D. Burgucu, Z. Kılıç, E. Burunkaya, Ö. Kesmez, Z. Yeşil, M. Akarsu, B. Kaya, ***Genotoxicity of Different Nano-sizes and Ions of Silica Nanoparticles***, Fresen Environ Bull, (2013a).

[123] B. Kaya, ***Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents***, Türk. J. Biol. 27: 241-246, (2003).

[124] E. Demir, S. Kocaoğlu, H. Cetin, B. Kaya, ***Antigenotoxic Effects of Citrus aurentium L. Fruit Peel Oil on Mutagenicity of Two Alkylating Agents and Two Metals in the Drosophila Wing Spot Test***, Environ. Mol. Mutagen. 50: 483-488, (2009).

[125] E. Demir, S. Kocaoğlu, B. Kaya, ***Antigenotoxic properties of chlorophyllin and chlorophylls in the Drosophila wing spot test***, Fresen Environ Bull, 19 (12): 3131-3138, (2010b).

[126] IFIC, International Food Information Council. Food İngredients Media Guide on Food Safetyand Nutrition, ***Ferrous lactate***, 2007-2009, http://www.foodinsight.org/Resources/Detail.aspx?topic=Food_Ingredients_ Colors, (erişim: 18/02/2014).

[127] T. Chapman, L. Partridge, ***Female Fitness in Drosophila melanogaster: An Interaction Between the Effect of Nutrition and of Encounter Rate with Males***, pp.755-759, (1996).

[128] S. Toyokuni, ***Role of iron in carcinogenesis: Cancer as a ferrotoxic disease***, vol. 100 (1), pp. 9–16, (2009).

[129] C. J. Potter, G. S. Turenchalk, T. Xu, ***Drosophila in cancer research***, TIG. 16 (1): pp. 33-39, (2000).

[130] J. Guzman-Rincon, U. Graf, ***Drosophila melanogaster somatic mutation and recombination tast as a biomonitor***, **Biomonitor and Biomarkers as Indicators of Environmental Change**, New York, Butterworh, F. M. (editor). pp.169-181, (1995).

[131] B. Kaya, S. Kocaoğlu, E. Demir, ***Analysis of UV-Stimulated Recombination in the Drosophila SMART Assay***, Environ. Mol. Mutagen. 47 (5): 357-361, (2006).

[132] E. Demir, S. Kocaoğlu, B. Kaya, ***Genotoxicity testing of four benzyl derivatives in the Drosophila wing spot test***, Food Chem. Toxicol. 46: 1034-1041, (2008a).

[133] G. Vales, E. Demir, B. Kaya, A. Creus, R. Marcos, ***Genotoxicity of cobalt nanoparticles and ions in Drosophila***, Nanotoxicology, 7 (4): 462-468, (2013).

[134] U. Graf, S.K. Abraham, J. Guzmán-Rincón, F.E. Würgler, ***Antigenotoxicity studies in Drosophila melanogaster***, Mutat. Res. 402: 203-209, (1998).

[135] V. Karekar, S. Joshi, S.L. Shinde, ***Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the Drosophila wing spot test***, Mutat. Res. 468: 183-194, (2000).

[136] E. Takahashi, K. Fujita, T. Kamataki, S. Arimoto-Kobayashi, K. Okamoto, T. Negishi, ***Inhibitionof human cytochrome P450 1B1, 1A1 and 1A2 by antigenotoxic compounds, purpurin and alizarin***, Mutat. Res. 508: 147-156, (2002).

[137] B. Kaya, A. Creus, A. Velazquez, A. Yanikoglu, R. Marcos, ***Genotoxicity is modulated by ascorbic acid - Studies using the wing spot test in Drosophila***, Mutat. Res. 520 (1-2): 93-101, (2002).

[138] E. Demir, S. Kocaoğlu, B. Kaya, ***Protective Effects of Chlorophyll Against the Genotoxicity of UVB in Drosophila SMART Assay***, Fresen Environ Bull, 17 (12): 2180-2186, (2008b).

ÖZGEÇMİŞ

Süleyman DAYANIKLI, 10.10.1983 tarihinde Adana' da doğdu. İlköğretim ve Lise Eğitimini Adana' da sırasıyla İkinci İnönü İlkokulu, Hürriyet Ortaokulu, Özel Gündoğdu Koleji ve Mehmet Kemal Tuncel Lisesinde tamamladı. 2006 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilgisi Öğretmenliği bölümünden mezun oldu. 2007 yılında Diyarbakır İli Silvan ve Kulp ilçelerinde askerliğini tamamladı. 2008 yılında bir yıl süreyle Adana Yunusoğlu Köyünde bulunan Yeni Hacıali İlköğretim Okulunda ve 2009 yılında bir sömestr süresi boyunca Adana Yüreğir İlçesinde bulunan Şehit Ali Gaffar Okkan İlköğretim Okulunda ücretli öğretmenlik yaptı. 2009 yılında Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Laborant ve Veteriner Sağlık bölümünden ve Çankırı POMEM' den mezun oldu. Göreve başladığı Edirne' de 2010 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalı' nda bir yıl süreli bilimsel hazırlık programını tamaladıktan sonra yükseklisans eğitimine başladı.