

BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN İNSAN
PERİFERAL LENFOSİT KÜLTÜRÜ ÜZERİNE OLAN
ETKİSİNİN COMET YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

ZEYNEP FINDIKLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
2012

CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİT
KÜLTÜRÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN COMET YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ

ZEYNEP FINDIKLI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. ŞİFA TÜRKOĞLU

SİVAS
2012

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Doç. Dr. Serdar KOCA

Üye: Yrd. Doç. Dr. Nükhet AKPINAR

Üye (Danışman): Doç. Dr. Şifa TÜRKOĞLU

ONAY

Bu tez çalışması, 04/06/2012 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir

Prof. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu' nun 24.09.2008 tarihli ve 009 sayılı toplantısında kabul edilen Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

ÖZET

BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN İNSAN PERİFERAL LENFOSİT KÜLTÜRÜ ÜZERİNE OLAN ETKİSİNİN COMET YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Zeynep FINDIKLI

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Şifa TÜRKOĞLU

2012, 94 Sayfa

Bu çalışmada gıda sektöründe ve diyabet hastalarında yapay tatlandırıcı olarak kullanılan Aspartam, Asesulfam K, Sorbitol ve Sakkarinin insan periferik lenfosit hücrelerinde genotoksitesisi tek hücre jel elektroforezi (comet) tekniği kullanılarak araştırılmıştır. Tüm dozlar için (1.25, 2.5 ve 5 ppm) 1 saat süre insan lenfosit hücrelerine, yukarıda isimleri verilen maddeler belirtilen doz ve sürede muamele edilmiştir.

Katkı maddelerinin etkileri incelenmiş ve bu kimyasalların uygulandığı doz aralıklarında kontrol grubuna göre oluşturdukları DNA hasarları karşılaştırılmıştır. DNA kırıklarının elektroforezde oluşturduğu, kuyruk uzunluğu (tail length), kuyruk yoğunluğu (tail intensity), kuyruk momenti (tail moment), kuyruk alanı (tail area), kuyruk ortalaması (comet mean), kuyruktaki DNA (DNA tail), kafadaki DNA (DNA head) ve olive tail moment (baş kısmının merkezi ile kuyruk kısmının merkezinin arasındaki mesafe farkının % Tail DNA ile çarpımının 100 e bölünmesi ile elde edilen bir değerdir) bakımından comet parametreleri ile kontrol grubuna göre değerlendirilmesi yapılmıştır. İstatistiksel analizi SPSS 15 programı, fotoğraf analizi BAB BS 200 Pro programı ile yapılmıştır. Araştırma sonucuna göre 4 farklı gıda tatlandırıcısının kısa süreli muamelede in vitro genotoksik etkileri olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Comet Assay, DNA Hasarları, İnsan Periferik Lenfosit Kültürü, Gıda Katkı Maddeleri, Tatlandırıcılar

ABSTRACT

DETERMINATION OF THE EFFECT OF SOME FOOD ADDITIVES ON THE HUMAN PERIPHERAL LYMPHOCYTE CULTURE USING COMET ASSAY

Zeynep FINDIKLI

Master of Science Thesis, Department of Biology

Supervisor: Assist: Assoc. Prof. Dr. Şifa TÜRKOĞLU

2012, 94 pages

In this study, the genotoxicity of artificial sweeteners Aspartame, Acesulfame-K, Sorbitol and saccharin used in food industry and in patients with diabetes was investigated in human peripheral lymphocyte cells by using single cell gel electrophoresis(comet) technique. For all doses (1.25, 2.5 and 5 ppm), the human lymphocyte cells were treated with the substances named above for one hour.

Additives were also analyzed and DNA damages related to those chemical additives in the study group were compared to the control group within treated dose intervals. DNA breaks observed on Comet were assessed in terms of tail length, tail intensity, tail moment, tail area, comet mean, DNA tail, DNA head, and olive tail moment using Comet and control group parameters. Statistical and photographic analysis was performed using SPSS 15 and BAB BS 200 Pro, respectively. According to the present study, it has been demonstrated that there are genotoxic effects from the four cyclamates tested in the short span of treatment.

Key words: Comet Assay, DNA damages, Culture of human peripheral lymphocytes, Food additives, Cyclamates (Sweeteners)

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum Sayın Hocam Doç. Dr. Şifa TÜRKOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fotoğraf çekme aşamasında laboratuvarını kullanmamıza imkan sağlayan ve yardımcı olan Doç. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN' a teşekkür ederim.

Analiz aşamasında yardımcı olup, zamanını ayıran BAB Görüntü Analiz ve İşleme sistemlerinin sahibi Sayın Babacan UĞUZ' a çok teşekkür ederim.

Projemizi maddi yönden destekleyen Cumhuriyet Üniversitesi CÜBAP Araştırma Fonu' na teşekkür ederim.

Çalışmalarım ve öğrencilik hayatım boyunca maddi, manevi yardım ve desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek Lisans yapmamda en büyük destekçim olan ve varlığını her zaman yanımda hissettiğim Erkan HABİBOĞLU' na teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	IX
KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GIDA KATKI MADDELERİ.....	6
2.1. Gıda Katkı Maddesinin Güvenliliği ve Kullanılacak Dozun Belirlenmesi.....	6
2. 2. Gıda Etiketleme ve “E” Numaraları.....	7
3. TATLANDIRICILARIN SINIFLANDIRILMASI.....	7
3. 1. Kullanılan Tatlandırıcıların Özellikleri.....	8
3. 1.1. Asesulfam K.....	8
3. 1. 2. Aspartam.....	11
3. 1. 3. Sakkarin (Saccarin).....	17
3. 1. 4. Sorbitol.....	20
3.2. Tatlandırıcıların Gıdalarda Kullanım Alanları.....	22
4. DNA HASARI.....	23
4.1. Mutasyonlar.....	23
4.2. Genotoksisite ve Değerlendirme Yöntemleri.....	25
4.3. DNA Hasarı ve Biyogöstergeler.....	27
4.3.1.Maruziyet Biyogöstergesi.....	28
4.3.2. Etkinin Biyogöstergesi.....	28
4.3.3. Duyarlılığın Biyogöstergesi.....	29
4.4. Biyogöstergelerin Önemi.....	30
5. COMET TEKNİĞİ (SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS – SCGE).....	31
5.1.Tarihçesi.....	31

5.2	Comet Metodunun Kullanım Alanları.....	33
5.2.1.	Çevre Sağlığını Tespit Etmede.....	34
5.2.2.	Pestisit Çalışmalarında.....	35
5.3.	Comet Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları.....	35
5.4.	Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler.....	36
5.5.	Comet Yönteminde DNA Hasarının Değerlendirilmesi.....	37
5.6.	Uygulama Protokolü.....	39
5.7.	Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi.....	40
6.	MATERYAL METOD.....	42
6.1.	Yöntemde Kullanılan Aletler.....	42
6.2.	Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	42
6.3.	Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması.....	43
6.3.1.	Fosfat Tamponu.....	43
6.3.2.	Lizis Çözeltisi.....	43
6.3.3.	Elektroforez Tamponu.....	44
6.3.4.	Nötralizasyon Tamponu.....	44
6.3.5.	Düşük Kaynama Dereceli Agaroz (LMA).....	44
6.3.6.	Normal Kaynama Dereceli Agaroz (NMA).....	45
6.3.7.	Boyama Çözeltisi.....	45
7.	COMET TEKNİĞİ PROTOKOLÜ.....	45
7. 1.	Lam Kaplama.....	45
7. 2.	Lenfosit İzolasyonu.....	45
7. 3.	Yaşayabilirlik Değerlendirilmesi.....	46
7. 4.	Elektroforez.....	46
7. 5.	Lamların Boyanması.....	47
7. 6.	Sonuçların Değerlendirilmesi.....	47
8.	BULGULAR.....	48
8.1.	Comet Parametreleri.....	48
8. 2.	Asesulfam K' nın DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri.....	49
8. 3.	Aspartam' ın DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri.....	54

8. 4. Sakkarin' in DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri.....	59
8. 5. Sorbitol' ün DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri.....	64
9. TARTIŞMA.....	69
10. SONUÇ.....	76
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	91
EKLER.....	92
EK-1 Etik Kurul Raporu.....	92
EK-2 Anket Formu.....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil - 1 Asesulfam K' nın Kimyasal Yapısı.....	8
Şekil - 2 Aspartam' ın Molekül Formülü.....	12
Şekil - 3 Aspartam' ın Biyolojik Dönüşümü.....	13
Şekil - 4 Sakkarin' in Molekül Formülü.....	17
Şekil - 5 Sorbitol' ün Kimyasal Formülü.....	21
Şekil - 6 Katalitik hidrojenasyon ile D-glikozdan, D-sorbitol oluşumu.....	21
Şekil - 7 Alkali Comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi.....	40
Şekil - 8 Görsel analiz ile Comet skorlaması.....	41
Şekil - 9 Cometlerin oluşturduğu kuyruk ve kafanın hücre üzerinde Gösterimi.....	49
Şekil - 10 Farklı dozlarda Asesulfam K ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması.....	51
Şekil - 11 Asesulfam K' nın oluşturduğu DNA hasarının Tail Length (kuyruk uzunluğu) in regresyon eğrisi.....	52
Şekil - 12 Kontrol grubunda değerlendirmeye alınan hücreler (x40).....	53
Şekil -13 Asesulfam K' nın 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	53
Şekil - 14 Asesulfam K' nın 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	53
Şekil - 15 Asesulfam K' nın 5.00 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan Periferal lenfosit hücreleri (x40).....	54
Şekil - 16 Farklı dozlardaki Aspartam ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde oluşan DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması.....	56
Şekil - 17 Aspartamı' nın oluşturduğu DNA hasarının Tail Length (kuyruk uzunluğu) in regresyon eğrisi.....	57

Şekil - 18 Aspartam' ın 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	58
Şekil - 19 Aspartam' ın 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan Periferal lenfosit hücreleri (x40).....	58
Şeki - 20 Aspartam' ın 5.00 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	58
Şekil - 21 Farklı dozlardaki Sakkarin ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması.....	61
Şekil - 22 Sakkarinin oluşturduğu DNA hasarının Tail Length (kuyruk uzunluğu) in regresyon eğrisi.....	62
Şekil - 23 Sakkarin' ın 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	63
Şekil - 24 Sakkarin' ın 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	63
Şekil - 25 Sakkarin' ın 5.0 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferal lenfosit hücreleri (x40).....	63
Şekil – 26 Farklı dozlardaki Sorbitol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması.....	66
Şekil – 27 Sorbitol ün oluşturduğu DNA hasarının Tail Length (kuyruk uzunluğu) in regresyon eğrisi.....	67
Şekil - 28 Sorbitol' ün 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen lenfosit hücreleri (x40).....	68
Şekil - 29 Sorbitol' ün 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen lenfosit hücreleri (x40).....	68
Şekil - 30 Sorbitol' ün 5.00 ppm' lik dozu ile muamele edilen lenfosit hücreleri (x40).....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge- 1 İnsan hücrelerinde invivo veya in vitro çalışılmakta olan DNA hasarı biyo göstergelerinden bazıları.....	29
Çizelge - 2.a Farklı dozlarda Asesulfam K ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	50
Çizelge - 2.b Farklı dozlarda Asesulfam K ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	50
Çizelge - 3.a Farklı dozlardaki Aspartam ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	55
Çizelge - 3.b Farklı dozlardaki Aspartam ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	55
Çizelge - 4.a Değişik dozlardaki Sakkarin ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	60
Çizelge - 4. b Değişik dozlardaki Sakkarin ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	60
Çizelge - 5. a Değişik dozdaki Sorbitol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	64
Çizelge - 5. b Değişik dozdaki Sorbitol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferal lenfositlerinde DNA hasarı.....	65

KISALTMALAR DİZİNİ

ADI: Günlük alınmasına izin verilen miktar

ALS: Alkali labil bölgeler

AP: Apürinik/apirimidik bölge

BER: Baz eksisyon tamir mekanizması

b.w: Vücut ağırlığı (Body Weight)

CAC: Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu

CHO: Çin Hamster Ovaryum

DAPI: 4,6-Diamidino-2-Phenyl indole

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DMSO: Dimetil sülfoksit

DSB: Çift zincir kırığı

EDTA: Etilendiamintetra asetik asit

FAO: Gıda Tarım Örgütü

FDA: Gıda ve ilaç idaresi

GKM: Gıda Katkı Maddeleri

i.p: Intraperitoneal

JECPA: Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi

KA: Kromozomal Anormallik

KKD: Kardeş Kromatid Değişimi

LMA: Düşük kaynama noktalı agaroz

NMA: Normal kaynama noktalı agaroz

NOAEL: Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz

MN: Mikronükleus

PAH: Polisiklik Aromatik Hidrokarbonlar

PBS: Fosfat tuz tamponu

PCB: Polisiklik Bileşikler

SCF: Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi

SSB: Tek zincir kırığı

SCGE: Tek hücre jel elektroforezi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

μ l: mikrolitre

mg: Miligram

1. GİRİŞ

Günümüzde besinlerin üretim ve tüketim ilişkileri gıda katkı maddelerinin kullanımını teknolojik bir zorunluluk olarak ortaya koymaktadır. Endüstrinin gelişmesi ile besin üretiminin ve işlenmesinin artması gıda katkı maddeleri kullanımını da artırmıştır. Ev dışında çalışanların artması, beslenme alışkanlıklarının değişmesi, besin hazırlama için az zaman kalması veya besin hazırlama için az vakit harcama isteği yarı hazır veya ticari olarak tamamen hazırlanmış olan besin üretimini teşvik etmiş, bu da gıda katkı maddeleri kullanımını kaçınılmaz kılmıştır. Gıda sektörüne yeni ve üstün teknolojilerin kazandırdığı değişik üretim teknikleri, buna göre ürünlerin çeşitlenmesi, tüketici beğenisinin değişmesi ve bilinçlenmesi, mevsimlik gıdaların yılın her döneminde tüketilme eğilimlerinin artması, ürünlerin raf ömrünün uzatılması kalitede standardizasyon zorunluluğu, daralan gıda kaynaklarının rasyonel kullanımı gibi hususlar, gıda endüstrisinde kullanılan tekniklerin yanı sıra gıda katkı maddelerinin kullanımını zorunlu hale getirmiştir [1].

Gıda ve sağlık hizmetlerindeki gelişmeler ve son yenilikler eski dönemlerde karşılaşılan bazı sorunları ortadan kaldırırken beraberinde bazı yeni sorunları getirmiştir. Sorumlu örgütlerce kullanılmasına izin verilen katkı maddelerinin bazıları, sağlık açısından herhangi bir sakınca yaratmamalarına karşın, bazıları sürekli alınmaları halinde tehlikeler doğurabilecek niteliktedir. Örneğin insan sağlığını etkileyen ve yaşam sürecini kısaltan birçok hastalık hijyen bilgilerinin gelişmesi, tıbbın başarısı ve modernizasyonu sayesinde eski önemini kaybetmiş, bunun yanında uygarlıkla ilişkili kalp-damar, kanser ve karaciğer hastalıkları etkin hale gelmiş, ayrıca eksik veya aşırı beslenme bozukluklarının olduğu bazı hastalıkları yaygınlaştırmıştır [2]. Gıda katkı maddelerinin son yıllarda geniş bir şekilde kullanılması ile toplumlarda kanser insidansının arttığı, nedeni bilinmeyen hastalıklar ve ölümlere sebep olduğu düşünülmektedir [3]. Bu nedenle özellikle son 25 yıl içerisinde tüketiciyi bu maddelere karşı koruyan kurumlar ve bunların yaptığı yasalar ortaya çıkmıştır. Bu hizmetler bazı ülkelerde sağlık kurumlarınca yapılırken bazı ülkelerde ise diğer resmi kontrol kurumları tarafından yürütülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda başlangıçta zararsız gibi görünen birtakım katkı maddelerinin sağlığa zararlı oldukları saptanmıştır. Ancak kısa bir süre sonra bu çalışmaların ve eldeki bilgilerin uluslararası ticarete yetersiz olduğu anlaşılmıştır. Bir ülkede kullanılmasına izin verilen herhangi bir katkı

maddesine diğerk bir ÷lkede izin verilmemekte, bu ise ÷lkelerin birbirleriyle ticaret yapmalarını engellemektedir. Bunun sonucu olarak tüm çalışmalar uluslararası düzeye kaydırılmıştır [2].

Katkı maddeleri terimi Latince *addere* olarak ifade edilen katmak kelimesinden türemiştir. Gıda katkı maddeleri, gıdalarda mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı arttırma, besleyici değeri koruma, raf ömrünü arttırma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duyuusal özellikleri düzeltme gibi pekçok amaçla katılan maddelerdir [4]. Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization-FAO) nün ortak çalışmaları ile oluşturulmuş Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (Codex Alimentarius Commission-CAC) tarafından verilen Gıda Katkı Maddeleri tanımı oldukça ayrıntılıdır. Bu tanımda, Gıda Katkı Maddesi “tek başına gıda olarak kullanılmayan ve gıdanın tipik bir bileşeni olmayan, besleyici değeri olsun veya olmasın, imalat, işletme, hazırlama, uygulama, paketlenme, ambalajlama, taşıma, koruma ve depo aşamalarında, gıdalarda teknolojik amaçla katılan ya bu gıdaların içinde veya yan ürünlerinde doğrudan ve dolaylı olarak bir bileşeni haline gelen veya bunların karakteristiklerini değiştiren maddelerdir” olarak ifade edilmektedir. Bu tanım gıdalara istenilmediği halde bulaşan kontaminantları veya besleyici kaliteyi arttırmak amacıyla katılan maddeleri içermemektedir [5].

Gıdalara istenilerek kimyasal madde katılımı ile ilgili tarihsel gelişmeler incelendiğinde, tuz ve odun tütsüsünün bilinen en eski katkı kullanma yöntemleri olduğu anlaşılmaktadır. Gıda boyalarının kullanımının M.Ö. 3500 yıllarında eski Mısır’ a kadar dayandığı; M.Ö. 3000 yıllarında ise et ürünlerini saklamada tuzdan yararlanıldığı, M.Ö. 900 yıllarında hem tuz, hem de odun tütsüsünün gıda saklama yöntemleri olarak kullanıldığı gör÷lmektedir. Ortaçağda tuz ve odun tütsüsünün yanı sıra, etlere nitrat konarak hem botilizm önlenmeye çalışılmış, hem de etin renginin daha sağlıklı gör÷ndüğü fark edilmiştir [5]. M.Ö. 50’ ler de baharatlardan lezzet verici olarak yararlanılmış, gıda boyaları ise günümüzden yaklaşık 3500 yıl kadar önce Mısırlılar tarafından renklendirici amaçla kullanılmışlardır. 19. yüzyıldaki hızlı şehirleşmenin paralelinde katkı maddelerinin kullanımları, özellikle gıdaları bozulmalara karşı koruma amacıyla yaygınlaşmış olup günümüzde ise bu maddeler gelişen gıda teknolojisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmuşlardır [4].

Gelişen teknoloji ve yaşam koşulları yeni katkı maddeleri hayatımızda büyük yer kazanmıştır. Bunlardan biride gıda tatlandırıcılarıdır. Gıdaya tatlı tadı veren ve şeker olmayan maddeler olarak tanımlanan tatlandırıcılar, farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeni ile değişik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Tatlandırıcı etkisi bilinen en eski madde şeker grubundaki sukroz olup, glukoz, fruktoz, hidrolize nişasta şurupları ve yüksek fruktozlu mısır şurupları da tarımsal kaynaklı doğal tatlandırıcılardır. Ancak, Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO) ve Gıda Tarım Örgütü (FAO)' nün oluşturdukları Uluslararası Gıda Kodeksi Komisyonu (CAC) tarafından yukarıda sayılan ve şeker özelliği taşıyan bu maddeler gıda katkı maddesi olarak nitelendirilmemektedir [5].

Şekerler dışında tatlandırıcı etkisi bulunan bitkilerin gıda ve içeceklerde kullanımı özellikle tropikal ülkelerde asırlar öncesine dayanmaktadır. Örneğin, Marantaceae familyasına ait *Thaumatococcus daniellii* bitkisinin su ile ekstraksiyonu sonucu elde edilen tomatin seyreltik sukroz çözeltisinden 3500 kez daha fazla tatlıdır ve Batı Afrika' lılar tarafından asırlardır kullanılmaktadır [5]. 1878 yılında Sakkarin' in keşfi ile kuvvetli tatlandırma özelliği bulunan yapay tatlandırıcıların kullanılma devri başlatılmış oldu. Bu tarihten sonra tatlandırıcı özelliği bulunan birçok madde bulunmuş, fakat toksikolojik özellikleri yüzünden ancak bunların bazılarının (asesulfam K, aspartam, alitam, sakkarin, siklamat, dulcin, neotam, gibi) kullanımına izin verilmiştir. I. ve II. Dünya savaşları sırasında oluşan şeker kıtlığı dolayısıyla ve şekerden daha ucuz olması nedeni ile Sakkarin kullanımı yaygınlaşmıştır [5].

Son 30 yıldır gelişmiş ülkeler başta olmak üzere, yiyecek maddelerinde kullanılan katkı maddelerinde ciddi bir artış olduğu bilinmektedir. Örneğin sadece İngiltere' de bir yıl içinde kullanılan katkı maddelerinin toplam ağırlığının iki yüz bin tonu geçtiği sanılmaktadır. Çoğu aroma lezzetlendirici olmak üzere toplam altı bin civarında katkı maddesi bulunmaktadır ve tatlandırıcı maddeler de gıdalarda kullanılan önemli bir grubu oluşturmaktadır. Günümüzde diyetlerdeki şekerin ve şeker içeren gıda maddelerinin tüketimindeki hızlı artış, uzun dönem sonra bazı sağlık problemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Yüksek oranda şeker tüketiminin insanlarda diş çürümelerine, aşırı şişmanlamaya, kalp hastalıklarına sebep olduğu, ayrıca doğal şekerin kan şekerini hızla arttırdığı ve buna bağlı olarak diyabetli hastalarda zararlı etkiler oluşturduğu görülmüştür [6]. İnsan sağlığını önemli ölçüde tehdit eden bu hastalıkların tedavisi için, medikal tedavinin yanı sıra bilinen en etkili yol, aktivitenin artırılmasıyla

birlikte diyetlerin düzenlenmesidir. Bu hastalıkların tedavisi için hastaların diyetlerinde şeker ve şekerli yiyeceklerin tüketimini kısıtlama yoluna gidilir. Bunun sonucunda doğal şekerler, bazı durumlarda yerlerini tatlandırıcılara bırakmak zorunda kalmıştır [7]. Hem tatlı tadı isteyen, hem de fazla enerji almak istemeyen tüketiciler ve tüketici beklentilerini karşılayarak kar etmek isteyen üreticiler tatlandırıcı kullanımını desteklemektedir. Yaklaşık bir asırdır kullanılan Sakkarinin, deney hayvanlarında mesane kanserine yol açtığı belirlenmesi ile kullanımı yasaklanmış, ancak bu deneylerde çok aşırı dozların kullanılmış olması, 6000 diyabetli üzerinde yapılan çalışmalarda Sakkarin kullanımı ile mesane kanseri arasında ilişki bulunamaması ve 5000 den fazla mesane kanserli hastayı içeren 6 çalışmada da yapay tatlandırıcı kullanımı ile mesane kanseri arasında ilişki olmaması nedeniyle kullanımına izin verilmiştir [6].

Yaklaşık son 50 yıldır şeker yerine tatlandırıcı kullanımı giderek artmaktadır. Yüksek oranda karbonhidrat, özellikle şeker tüketiminin insanlarda kardiyovasküler hastalıklar başta olmak üzere obezite (şişmanlık), Diyabetes mellitus (şeker hastalığı) ve diğer hastalıklara neden olduklarının belirlenmesi sonucu şekerler dışındaki tatlandırıcılara ilgi giderek artmıştır [5]. Sistemli diyet reçetelerinin düzenlenmesine olan gereksinim ve tatlandırıcı katılmış gıdaların geniş çapta üretimi ile piyasada bu tip katkı maddelerini içeren düşük kalorili ve diyet amaçlı gıda çeşitlerinde de artış gözlenmiştir. Şeker alkoller (polioller) gastrointestinal kanaldan yavaş emilmeleri ve toksik keton bileşiklerinin oluşumunu azaltmaları nedeniyle kan glukoz ve insülin düzeylerine daha az etki ederler. Bu nedenle de diyabetikler için uygun oldukları belirtilmektedir. Enerji düzeylerinin normalde 4 kal/g olması beklenirken, yavaş emilmeleri nedeniyle daha düşüktür. Avrupa Birliği (AB) Etiketleme direktifinde poliollerin enerji değerini 2 kal/g olarak belirtmiştir. Osmotik diareye (ishale) sebep olmaları nedeniyle besinlerde kullanımları ve günlük alımları sınırlandırılmaktadır. Bireysel ayrıcalıklar olmakla birlikte günde 50 g' ın üzerinde alındıklarında ishale neden olabilirler. Günümüzde tatlandırıcıların katıldıkları gıdalar, diyabetik ve metabolik bozuklukları olan kişilerin yanında vücut ağırlığını dengelemek isteyen kişiler tarafından da yoğun bir şekilde tüketilmektedir.

Bu maddelerin tüketimi arttıkça, bazı rahatsızlıklarla olan bağlantılara yönelik bulgular da ortaya çıkmaya başlamıştır. Bunların içinde en sıkça görülenleri; egzema, astım, baş ağrısı, alerjik kaşıntılar, gastrit rahatsızlıklar, özellikle çocuklarda olmak

üzere ishal, hiperaktivlik ve aşırı duyarlılık (hypersensitivity) tır [8-11]. Gıda katkı maddelerinden olan tatlandırıcıların muhtemel olan bu etkileri yanında çok daha ciddi olan etkileri gelecek nesillerin sağlıksız olmasına sebep olabilecek mutasyon veya kanser oluşturma riskleridir. Bir kimyasal maddenin böyle bir genotoksik ve kanser oluşturma etkisinin olup olmadığının belirlenmesi kısa süreli mutajenite, kanserojenite ve teratojenite testleri ile mümkün olabilmektedir.

Katkı maddelerinin gıdalarda kullanılabilmesi için, analizlerinin yapılabilmesi, sonuçlarının ölçülebilmesi ve çok sıkı bir şekilde kontrol altına alınmış koşullarda hayvanlar üzerinde emniyetinin sağlanmış olması gerekmektedir [3]. Bir katkı maddesinin kullanımına yasal olarak izin verilse bile o madde ancak birtakım kriterlere uygun olarak kullanılabilir. Kullanımına izin verilen katkı maddesi; yalnızca izin verildiği gıdada, belirlenen en yüksek doz aşılmadan kullanılmalıdır. Gıdadaki herhangi bir hatayı örtmek veya tüketiciyi yanıltmak için kullanılmamalı ve kullanıldığı gıdanın etiketinde kullanım miktarı yazılmalıdır [12].

Tatlandırıcıların genotoksik ve kanserojenik etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalarda daha çok ilk yapay tatlandırıcı olan Sakkarin üzerinde durulmuştur ve Sakkarinin hem mutajenik hem de kanserojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [13-26]. Nunes ve ark. [27] *Escherichia coli* ve plazmid DNA' sı ile yaptıkları çalışmada steviosid' in sitotoksik olduğunu ve DNA' da lezyon oluşturabileceğini bildirmişlerdir. Günümüzde yoğun olarak kullanılan diğer bir yapay tatlandırıcı olan aspartamın da genotoksik [28, 29] ve kanserojenik [30,31] etkiye sahip olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir. Bununla birlikte, yapay veya doğal birçok tatlandırıcının mutajenik ya da kanserojenik etkiye sahip oldukları bir çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [32-38].

Tatlandırıcıların teratojenik etkilerini belirlemek için yapılan çalışmalarda ise sadece D-Glukoz [39] ve Sakkarinin [40] teratojenik olduğu bildirilmiştir. Dawson ve Bantle [41] Sakkarin ile yaptıkları çalışmada Sakkarinin teratojenik olmadığını bildirmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada D-tagatoz, eritritol, hidrojene edilmiş nişasta hidrolizatları, isomalt, isomaltuloz (palatinoz), lactitol, neosferidin dihidrokalkon, steviosid ve sukralozla yapılan çalışmalarda bu tatlandırıcıların teratojenik olmadıkları bildirilmiştir [41].

2. GIDA KATKI MADDELERİ

2.1. Gıda Katkı Maddesinin Güvenliliği ve Kullanılacak Dozun Belirlenmesi

Gıda katkı maddelerine onay verilmeden önce, maddeler toksikinetik çalışma ve toksisite testlerine tabi tutulur. Toksisite test sonuçlarından elde edilen verilerden ulaşılan ilk değer NOAEL (No Observed Advers Effect Level- Gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz) tespit edilir. Diğer bir deyişle deney hayvanları ortalama yaşam sürelerinin %70-80' ini kapsayacak sürede test edilen gıda katkısını almışlar ve NOAEL dozunda hiçbir yan etki görülmemiştir. Bu değer tespit edildikten sonra aşağıdaki hesaplama yapılır.

NOAEL (mg/kg) : No Observed Advers Effect Level (Deney Hayvanlarında gözlenebilen hiçbir yan etki göstermeyen doz)

İnsanlarda güvenli olan doza ulaşılabilmesi için: NOAEL değeri, emniyet faktörüne bölünür. Emniyet faktörü genellikle 100 olarak belirlenmiştir. Diğer bir deyişle deney hayvanlarında hiçbir yan etki yaratmayan dozun yüzde biri insanlarda güvenli olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem 1954 yılından beri gıda katkıları için uygulanmaktadır.

ADI (Acceptable Daily Intake - Günlük alınmasına izin verilen miktar) değeri insanlarda güvenli doz olarak kabul edilir.

NOAEL değerinden ADI değerine aşağıdaki işlem yapılarak ulaşılır.

$$ADI = NOAEL / \text{Emniyet Faktörü (100)} \text{ mg/kg}$$

2. 2. Gıda Etiketleme ve “E” Numaraları

Hazır gıdaların paketleri üzerinde, kullanım amaçlarına göre GKM (Gıda Katkı Maddeleri)’ nin kategorileri, bunu izleyen özel adlar ve “E” numaraları ile belirtilir. “E” numaraları Avrupa Birliği ülkelerinde GKM’ lerini pratik bir kodlama yöntemi olarak geliştirilmiştir. “E” numara sistemi ile GKM’ nin temel işlevlerine göre sınıflandırılması [42] şöyledir:

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

3. TATLANDIRICILARIN SINIFLANDIRILMASI

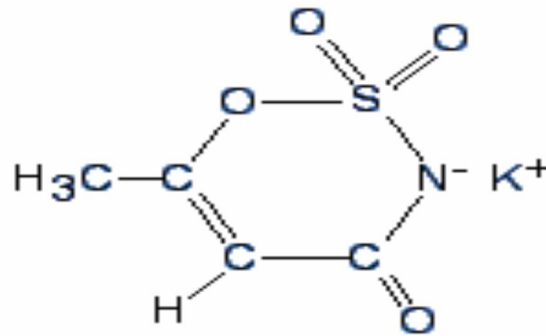
CAC, tatlandırıcı ifadesini “gıdaya tatlı tadı veren, şeker olmayan madde” olarak tanımlamaktadır. Tatlandırıcı özelliği bulunan maddeler farklı kimyasal yapılara sahip olmaları nedeni ile değişik fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikler gösterirler. Bu değişik özellikleri nedeni ile farklı şekillerde sınıflandırılabilirler. Örneğin, enerji verme durumuna göre, **enerji veren** ve **enerji vermeyen** tatlandırıcılar olarak sınıflandırılabilir gibi; genellikle bitkisel olan doğal kaynaklardan elde edilenler **doğal tatlandırıcı**, sentezleme yolu ile elde edilenler ise **yapay tatlandırıcı** olarak, ayrıca tatlandırıcılık etkisinin yanı sıra su tutarak hacim verme özelliği bulunanlar **hacim verici tatlandırıcı**, çok düşük miktarda kullanıldıklarında bile şiddetli tatlılık oluşturma özelliğinde bulunanlar ise **yoğun tatlandırıcı** olarak ifade edilmektedir [5].

3. 1. Kullanılan Tatlandırıcıların Özellikleri

3. 1.1. Asesulfam K

Asesulfam K, 1967 yılında Clauss ve Jensen [43] adlı araştırmacılar tarafından tesadüf sonucunda bulunmuş bir tatlandırıcıdır. Araştırmacılar, butin ve florosulfonil izosiyanatla yapılan çalışmalar sırasında sentezlenen dihidrookzatiyazon dioksitlerin tatlı tada sahip olduğunu, kısa zincirli alkil grupları içeren bileşiklerin ise maksimum tatlılığa sahip olduğunu saptamışlardır. Bu bileşikler içerisinde 6-metil-1,2,3 okzatiyazin-4(3H)-on- 2,2-dioksit adlı bileşiğin kolay sentezlenmesi nedeniyle yapay tatlandırıcı olarak kullanılması önerilmiştir. Bu maddeye ilk olarak “asetosulfam” adı verilmiş, 1978 yılında ise WHO tarafından “Asesulfam potasyum tuzu” adının kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiştir. Günümüzde ise kısaca “Asesulfam K” olarak ifade edilmektedir [5].

Asesulfam K’ nın sentezi birçok yolla yapılabilmektedir. Bu yollardan birisi florosulfonil izosiyanatın asetoasetik asit tersiyer-bütül ester ile reaksiyona girmesi olup, ısıtma ile CO₂ ve izobutan açığa çıkmakta ve N-(florosulfonil) asetoasetik asit amid oluşmaktadır. Baz varlığında bu bileşik okzatiyazon dioksit halkasını oluşturmaktadır. Alternatif olarak diketen ve amidosulfonik asidin reaksiyona girmesi ile asetoasetamid-N-sulfonik asit oluşturmaktadır, uygun nem çekici ajanlarla asesulfam asidi meydana gelmektedir. Söz konusu asidin KOH ile nötralizasyonu ile ise asesulfam K oluşmaktadır. Asesulfam K’nın kimyasal yapısı Sekil 1.’ de görülmektedir [44].



Şekil - 1: Asesulfam K’ nın Kimyasal Yapısı

Kapalı formülü ($C_4H_4NO_4SK$) olan Asesulfam K' nın Cas numarası: 55589-62-3 ve moleköl ağırlığı 201.2 dir. Beyaz, kokusuz ve kristal yapıda olan Asesulfam K' nın saf ve katı halinin oda sıcaklığındaki raf ömrü oldukça uzundur. Işıktta veya karanlıkta bekletilmiş örneklerde taze örneklere kıyasla hiçbir değışikliğin olmadığı belirlenmiştir. Asesulfam K yavaşça ısıtıldığında 225^0C de parçalanma başlamakta, hızlı ısıtıldığında ise parçalanma daha yüksek sıcaklıklarda olmaktadır. Asesulfam K' nın sudaki çözünürlüğü oldukça yüksek olup, çözünürlük sıcaklıkla birlikte artmaktadır. Örneğin, çözünürlüğü 20^0C ' deki suda 270g/L iken, sıcaklık 100^0C ' ye yükseldiğinde 1000g/L' nin üzerine çıkabilmektedir. Alkol gibi organik çözücülerde ise Asesulfam K' nın çözünürlüğü düşük (1g/L susuz etanol) olup, su miktarı arttıkça çözünürlükte artmakta ve %50' lik etanol de 100g/L' ye ulaşmaktadır. Asesulfam K, pH 3-7 arasında stabil iken, pH 3' ün altına düştüğünde çok düşük miktarda parçalanmanın başladığı saptanmıştır. Asesulfam K gıdalara ve içeceklere uygulanan normal işlem koşullarında parçalanmamakta, pişirme sırasında, pastörizasyon veya mikrodalga uygulamalarında da yapısında bir değışiklik olmamaktadır.

Asesulfam K, çabuk algılanan ve hoş bir tatlılık özelliğine sahiptir. Kalıcı bir tada sahip olmadığı için ağızda gıdanın kendi tadı algılanabilmektedir. Asesulfam K yaklaşık olarak sakkarozdan 200 kere daha tatlıdır. Diğer tatlandırıcılardan farklı olarak Asesulfam K' nın tatlılık şiddeti, konsantrasyon arttıkça azalmaktadır. Gıdaya katılan miktar arttıkça acı tat ve tat sonrası izlenim oluşmaktadır [5]. Asesulfam K tadım sonrası ağızda acımsı ve metalik bir his uyandırmaktadır. Buna rağmen gıda sanayinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Normal depolama koşulları dışında da stabilitesini korur. Son derece stabil bir karaktere sahip olan Asesulfam K' nın hidrolize olabilmesi için çok ekstrem şartlara ihtiyaç vardır [7]. Ekstrem pH ve sıcaklık şartları sonucunda bozulma ürünleri olarak aseton, CO_2 ve amonyum hidrojen sülfat veya amido sülfat ortaya çıkabilir. Yüksek asidik ortamda (pH 2.5) önemsiz miktarda stabil olmayan asetoasetamid ve asetoasetamid N sulfonik asit gibi ara bozulma ürünleri oluşurken, bazik ortamda (pH 7–10.5) aseto asetik asit ve asetoasetamid N sulfonik asit ortaya çıkabilmektedir [45].

Asidik gıda ve içeceklerde nötr olanlara kıyasla aynı konsantrasyonda Asesulfam K kullanımı ile daha yüksek tatlılık elde edilmektedir. Asesulfam K tek basına tatlandırıcı olarak kullanılabildiği gibi diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanıldığında sinerjist etki de oluşturmaktadır. Bu maddenin, Sorbitol, İzomalt ve Fruktoz ile birlikte

sinerjist etki yarattığı, Siklamat ve Aspartam ile de aynı etkinin söz konusu olduğu, Sakkarin ile bu etkinin çok düşük bulunduğu saptanmıştır. Sinerjist etkiye en uygun bileşim olan Asesulfam K / Aspartam karışımı için 1:1 veya 1:5 olarak belirlenmiştir. Asesulfam K' nın seker alkolleri ile karışım olarak kullanıldığı durumlarda hoş giden tatlar elde edilmiştir. Özellikle Asesulfam K / Sorbitol karışımında dolgun bir tatlılık elde edilmiş, bu nedenle söz konusu karışımın şekerlemelerde, meyve preparatlarında ve hacim gerektiren gıdalarda kullanılmasının uygun olduğu bildirilmiştir.

Asesulfam K; Sunette, Ace-K, Sweet One ve Sweet'n Safe gibi ticari isimler ile anılmaktadır [46]. Son yıllarda Sweet'N Low adıyla A.B.D. ve İngiltere' de kullanılan Asesulfam K preparatları, ülkemizde de satılmaya başlamıştır. Sweet'N Low' un pişirilen yiyeceklerde kullanılabilen Aspartam / Asesulfam K' nın kombinasyonu olan tablet ve poşet formları vardır. Dünyada 90' ın üzerinde ülkede kullanılmakta olup, kullanım alanı olarak çok geniş bir yelpaze oluşturur. Kullanıldığı bazı ürünler gazlı ve gazsız içecekler, meyve nektarları, meyve suyu konsantreleri, süt ürünleri, dondurmalar, tatlılar, marmelatlar, jöleler, reçeller, fırın ürünleri, cikletler, bazı sebze tursuları, diş macunları, ağız spreyleri farmasötiklerdir [5, 7, 47].

Asesulfam K, vücutta metabolize edilemez ve idrarla değişmeden dışarı atılır. Yapılan farmakolojik çalışmalar tüketilen Asesulfam K' nın %95' inin değişmeden idrarla dışarı atıldığını ve bu nedenle metabolize edilmediği için enerji vermediğini, aynı zamanda Asesulfam K tüketiminin vücuda potasyum alımını etkilemediği ortaya konulmuştur [48]. Yapılan bir çalışmada farelere ve köpek deneklere oral yol ile tek doz olarak verilen 10mg/kg Asesulfam K' nın hızla absorbe edildiği ifade edilmiştir. Doz verildikten 30 dk. sonra farelerin kan seviyesindeki maksimum düzeyin 0.75 ± 0.2 µg/mL iken köpeklerde 6.56 ± 2.08 µg/mL olduğu belirlenmiştir. Doz verildikten 1–1.5 saat sonra farelerde dozun %82 - 100' ünün, köpeklerde ise % 85-100' ünün idrarla dışarı atıldığı tespit edilmiştir. Asesulfam K' nın güvenilirliği 1970 yılı ortalarında hayvanlar üzerinde yapılan denemelerle ortaya konmuştur. İlk yapılan denemede Asesulfam K içeren ve Asesulfam K içermeyen diyetle beslenen kontrol farelerinin her ikisinde de çeşitli tümörler belirlenmiş bu nedenle bir sonuca varılamamış, ikinci denemede aynı şekilde başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Üçüncü denemede ise Asesulfam K ile beslenen dişi farelerde göğüs tümörü kontrol farelerine kıyasla daha fazla gelişmiştir. Bu tümörlerin birçoğu iyi huyluyken, 60 kontrol faresinden birinde, düşük dozlu Asesulfam ile beslenen 60 farenin ikisinde ve yüksek doz Asesulfam K ile

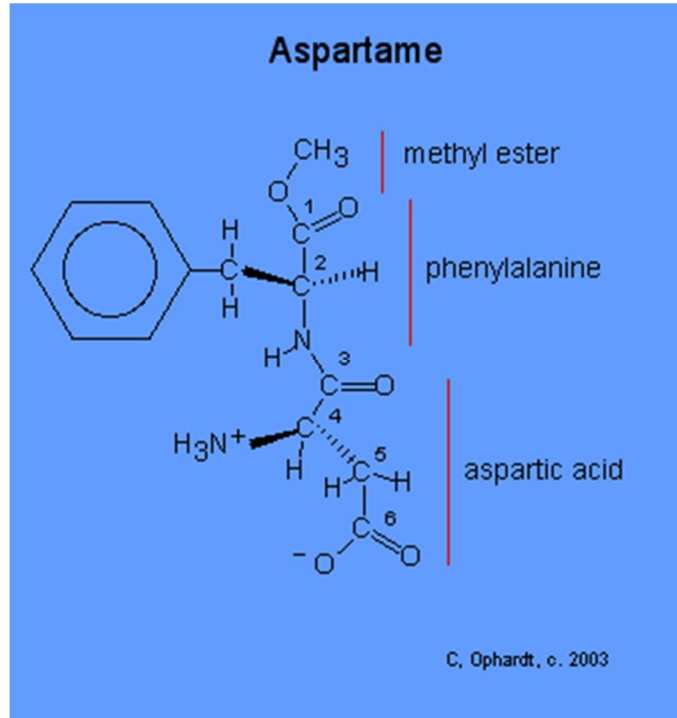
beslenen 60 farenin üçünde kötü huylu tümöre rastlanmıştır. Tatlandırıcı üreticileri kontrol farelerinde de tümöre rastlanılmakta olduğunu, bu nedenle tümöre sebep olarak yalnızca Asesulfam K' nın görülmemesinin gerektiğini ifade etmişler, böylece ABD' deki Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) bu açıklamaları kabul etmiş ve daha güvenli testlerin yapılmasına gereksinim duymamıştır [49].

Asesulfam K, Birleşik Gıda Katkıları Uzman Komitesi (JECFA) tarafından ilk olarak 1983 yılında güvenilirlik açısından değerlendirmeye alınmıştır. FDA ilk olarak 1988 yılında Asesulfam K' nın alkolsüz içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmasını onaylamıştır. FDA ve JECFA, Asesulfam K için günlük tüketilebilir miktarı (ADI) 15 mg/kg olarak belirlemiş, daha sonra Avrupa Birliği Bilimsel Gıda Komitesi (SCF) 1985 yılında tatlandırıcılar hakkında kapsamlı bir değerlendirme yayınlamış ve komite Asesulfam K' nın gıda ve içeceklerde kullanılmasını onaylamış, ancak günlük tüketilebilir miktarın 9 mg/kg olmasını önermiştir. Böylelikle Asesulfam K, Avrupa' da 1985 yılından ve ABD' de 1988 yılından bu yana kullanılmaktadır. FDA, Asesulfam K' nın güvenilirliğini 2003 yılının kasım ayında tekrar onaylamış ve genel amaçlı kullanımına onay vermiştir [50-51].

Asesulfam K' nın güvenilirliği 15 yıldan uzun süren 90' nın üzerinde çalışma ile resmi kurumlar tarafından onaylanmış ve aralarında Kanada, İngiltere, Fransa, İsviçre, İtalya, Belçika' nın da bulunduğu 90' nın üzerinde ülkede kullanılmaya başlanmıştır [51].

3. 1. 2. Aspartam

Aspartam, 1965 yılında Schlatter adlı araştırmacı tarafından Searle araştırma laboratuvarında aminoasitlerden gastrik peptid sentezlenmesi esnasında oluşan ara ürünlerin saflaştırılması sırasında elde edilen N-L-aspartil-L-fenilalanin-1-metil esterinin tatlılık özelliğinin belirlenmesi üzerine tesadüfi olarak bulunmuştur. Aspartam sentezi L-aspartik asit ve L-fenilalaninden veya L-fenilalaninin metil esterinden başlamaktadır. Bilinen peptid sentezi yolu Aspartam için de geçerli olup, aspartik asit için koruyucu gruba gereksinim duyulmaktadır. Bu durumda susuz formilaspartik asit kullanılmakta ve fenilalanin metilester ile reaksiyona sokularak N-formilaspartilfenilalanin elde edilmektedir. Oluşan bu maddenin hidroklorik asit ve metanol ile muamele edilmesi ile Aspartam elde edilmektedir. Kimyasal peptid sentezi dışında ticari olarak enzimatik yolla da Aspartam sentezlenebilmektedir [5].

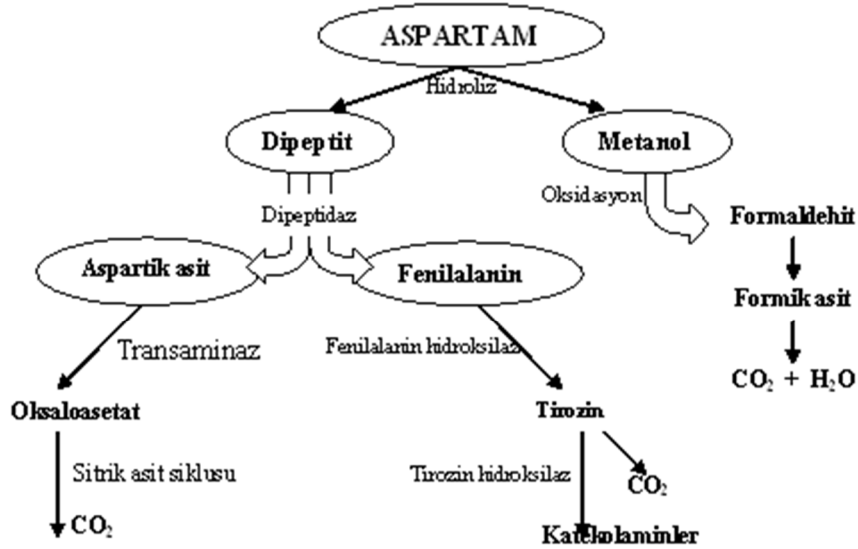


Şekil - 2. Aspartam' ın Molekül Formülü

Aspartam, aspartik asit ve fenilalanininden oluşmuş amfoter yapıda bir dipeptittir (Şekil-2). Sinonimi Aspartyl Phenylalanine Methyl Ester, kimyasal ismi N-L-a-Aspartyl-L-phenylalanine methyl ester, Cas numarası: 7421-84-3, kimyasal formülü $C_{14}H_{18}N_2O_5$, molekül ağırlığı 294,31 dir. 1 gr' ı 4 Kcal enerji verir. Tat karakteri Sakkarozu benzer, hafif geç algılanır, ısıya dayanıksızdır [52]. Aspartamın tatlılığının Sakkarozun verdiği tatlı tada benzer olduğu belirtilmektedir. Aspartamın tat algısı gecikmiş olarak ortaya çıkmakta ve uzun sürmektedir. Ayrıca Aspartamın özellikle meyve lezzetini arttırıcı özelliği olduğu da bilinmektedir [5, 53].

Aspartam, %4' lük Sakkaroz çözeltisinden 150–200 kat daha tatlı olup, beyaz toz yapıda ve kokusuz bir tatlandırıcıdır. Suda çok az oranda ($25^{\circ}C$ de %1 düzeyinde), alkolde ise belli oranda çözünmekte, katı ve sıvı yağlarda ise çözünmemektedir. Aspartamın sudaki çözünürlüğü pH ya bağlı olup, izoelektrik noktası olan pH 5.2 de ve üzerinde (1g/100mL) düşük çözünürlüğe sahiptir. Aspartamın sudaki çözünürlüğü sıcaklığa da bağlı olup, sıcaklık arttıkça çözünürlük de artmaktadır [5, 52, 54, 55]. Aspartam oral yolla tüketildiğinde iki şekilde metabolize olur (Şekil 3). Aspartam ya barsakta proteolitik ve hidrolitik enzimlerle aspartat (%40), fenilalanine (%50) ya da metanole (%10) kadar yıkılır.

Aspartamın yıkım ürünleri Sekil-3’ de görülmektedir. Bu bileşenler aminoasit ve metanolün absorpsiyonuna benzer şekilde absorbe olur ya da önce bir demetilasyon ile metanol ve aspartil fenilalanin dipeptidine yıkılır. Dipeptit bölümü, dipeptitlere özel bir transport mekanizması ile absorbe olduktan sonra mukoza hücresinde hidroliz olarak portal dolaşıma karışır. Metanol ise bilinen şekilde emilir. Bu bileşenler yaygın olarak tüketilen birçok gıdanın yapısında da bulunmakta ve insan vücudunda et, peynir, balık, sebze, meyve suyu ve anne sütünden de aynı şekilde metabolize edilmektedir [56-58]. Aspartam, yapısında bulunan dipeptidin vücutta tamamen sindirilmesi nedeni ile enerji veren (4 Kcal/g) bir madde olmakla birlikte Sakkaroz’a göre çok düşük miktarlarda kullanıldığından sağladığı kalori düşük düzeydedir.



Şekil-3 Aspartam’ ın Biyolojik Dönüşümü [59]

Aspartamın stabilitesi pH, sıcaklık ve nem gibi faktörlerden etkilenmekte olup, yüksek sıcaklık ve asidik ortamlarda ester bağı hidroliz olarak aspartilfenilalanin ve metanol oluşmaktadır. Oluşan metanol Aspartamın diketopiperazine dönüştürülmesiyle ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Diketopiperazin de hidrolize olarak aspartilfenilalanine dönüşmekte ve daha ileri safhada ise kendini oluşturan iki aminoasit; aspartik asit ve fenilalanini oluşturmaktadır. Bu oluşan maddeler tatlı tada sahip olmadıkları için gıdada tatlılık kaybına neden olmaktadır [5,55]. Bu nedenle

Aspartamın yüksek sıcaklık ve uzun süre depolama gerektirmeyen ürünlerde kullanılması önerilmektedir. 110°C nin üzerinde bozulma meydana gelir. Kuru ürünlerde Aspartamın stabilitesinin yüksek olduğu, nem miktarı arttıkça stabilitenin azaldığı saptanmıştır. %8 ve altındaki nem düzeylerinde Aspartamın oldukça stabil olduğu belirtilmektedir [5, 7]. Nemin bulunmadığı şartlarda Aspartam saf formunda birkaç yıl depolanabilir. Minimum raf ömrü optimum şartlarda 5 yıldır. Bu yüzden toz karışım gibi kuru uygulamalarda ya da tablet formunda hem üretim prosesi boyunca hem de ürünün raf ömrü boyunca stabilite son derece iyidir. Nem ve depolama göz önüne alındığında 30°C de %70 nispi nemde 6 ay depolamada Aspartamda bozulma tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra 20°C de %40 nispi nemde 1 yıl depolandığında %2 den daha az bozulma olduğu gözlenmiştir [52].

Protein yapıda olmasına rağmen Aspartam, içecek sektörü başta olmak üzere birçok gıda sektöründe başarılı bir stabiliteye sahiptir. Ortamın pH' sının raf ömrü üzerine etkisi yadsınamaz. Fosforik asit içeren ürünler en kısa raf ömrüne sahiptir. Stabilite için optimum pH 4.2 civarındadır. Ancak pH 3–5 civarında da stabilitesini koruyabilir. Aspartamın alkali pH değerine sahip sıvılarda kullanımı pek tavsiye edilmez. Aspartam stabilitesinin korunması açısından uygun pH seviyeleri ve kontrollü depolama sıcaklıkları önem taşımaktadır

Aspartam, diğer karbonhidratlar ve yüksek tatlılık potansiyeline sahip Sakkaroz, Glikoz, Fruktöz ve Sakkarin ile birlikte kullanıldığında çok çeşitli düşük kalorili ürünler elde edilebilmektedir. Aspartam diğer tatlandırıcılar ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki göstererek, kullanılan toplam tatlandırıcı miktarının azaltılmasını da sağlamaktadır. Aspartam, Asesulfam K ile birlikte kullanıldığında sinerjistik etki gözlenmekte olup, çeşitli gıdalarda yapılan çalışmalarda Aspartam / Asesulfam K karışımı için en etkili oranın 1:1 olduğu belirlenmiştir [5].

Aspartam aroma modifikasyonu amacıyla gıdalara %0.01, tatlılığı arttırmak için ise %0.6 düzeyinde katılmaktadır. Gıdalara ilave edilecek Aspartam miktarı gıdanın pH değerine, sıcaklığa, viskozite, toplam kuru madde miktarı ve ürünün spesifik aromasına göre değişiklik göstermektedir.

Gazlı içecekler, tatlılığı ve tüketimi fazla olan gıda maddeleridir. Aspartamın gazlı içecekler ile uyumu; pH, depolama zamanı, aspartamın dağılım zamanı ve konsantrasyon ile ilişkilidir. Gazlı içeceklerde kullanılan Aspartam düzeyi pH ve gazlı

içecek cinsine göre farklılık göstermektedir. Tahıl rnlerinde, bir kısım şeker yerine Aspartam kullanılmaktadır. Kullanılan Aspartam ile şeker miktarı azaldığı için daha fazla tahıl ile daha az enerji eldesi mümkün olabilmektedir. Aspartam tahıl ürünleri üzerine püskürtme ile verilebilmektedir. şekerlemelerde (şekersiz naneli şekerler, sert şekerlemeler, çikolata, sakız, yumuşak şekerlemeler vb.) Aspartamın diş rmelerine neden olmaması ve kalori değerinin düşük olması nedeniyle yaygın şekilde kullanılmaktadır. şeker oranı yüksek olan bu ürünlerde Aspartam kullanımı ile teknolojik problemler de önemli düzeyde zmlenmiş olmaktadır. Aspartam bunların dışında tatlı turşularda, kremalarda, reel, marmelat, jöle ve benzeri pasta dolgu maddelerinde de kullanılmaktadır [55].

Aspartamın vücuda ařırđ miktar alımından sonra beyin hasarına, tümörlere neden olduğu konusundaki endişeler, yapılan çalışmalar sonucunda giderilmiştir. Aspartamın bilinen hiçbir yan etkisi yoktur. Sağlıklı yetişkinler, iki yaşından büyük çocuklar, gebe, emziren kadınlar ve diyabetli hastalar için sağlıklı olduğu ve rahatlıkla kullanılabileceği FDA tarafından belirtilmiştir [7].

Aspartamın birçok kuru gıdada (kahvaltılık tahıllar, jelatin, puding, sakız gibi) tatlandırıcı olarak kullanılması 1974 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Bu onay 1983 yılında gazlı içecekleri de kapsamıştır. İngiltere’ de kullanımına ilk olarak 1982 yılında onay verilmiştir. 1985 yılında Amerikan Tıp Birliği (AMA) mevcut kanıtların sanılanın aksine Aspartamın normal insanlar tarafından tüketiminin güvenli olduğunu ifade etmiştir. 1996 yılında FDA Aspartamın yiyecek ve içeceklerde genel amaçlı kullanımını onaylamış, böylece Aspartam 100’ den fazla ülkede kullanılmaya başlanmıştır [48].

Aspartamın piyasaya sürülmesinden sonra bazı bilimsel itirazlar gelmiş ve bunlar hayvan ve insan deneyleri ile incelenmiştir. Onaylanmadan önce olduğu gibi bu itirazlar büyük oranda metabolik bileşenlerin ařırđ yüksek dozlarda verilmesiyle oluşabilecek hipotetikal toksisite üzerinde yoğunlaşmış ve aspartik asitin potansiyel nörotoksisitesi, fenilalaninin beyin fonksiyonlarına potansiyel etkileri ve metanol metaboliti formatın potansiyel toksisitesini içermiştir. Bu itirazlar aspartamın onaylanmasından önce dünya genelinde resmi kuruluşlar tarafından tatmin edici bir şekilde zmlenmiş olmasına rağmen onaylandıktan sonraki ek çalışmalarla da preklinik güvenlik paradigmaları tekrar gözden geçirilmiş; Aspartam tüketiminin kabul edilebilir günlük tüketim düzeyine oranđ, metabolizması, aspartat ve eksitoksisite,

fenilalanin ve nörokimya, metanol toksisitesi, Aspartamla ilişkilendirilen diğer istenmeyen etkiler, duyarlı popülasyonlarda kullanımı, ağırlık kontrolündeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalarla elde edilen veriler daha önceki çalışmaların sonuçlarını daha da kesinleştirmiş ve Aspartam güvenilirliği üzerine oluşan veri tabanını genişletmiştir [57].

Fenilalaninin tirozine dönüşümünün engellenmesi bir nevi kalıtsal bir metabolizma bozukluğu göstergesidir. Bu nedenle birey fenilalanini tirozine çeviremez. Bunun sonucunda vücutta fenilalaninin değişik katabolitleri meydana gelir, böylece fenilpirüvik asidin değişimi ile oluşan fenilasetik asidi ortaya çıkar. Fenil asetat ise karaciğerde glutamin ile birleşerek ve fenilasetilglutamin şeklinde idrarla dışarı atılır. Bu olgu fenilketonuri hastalarında ve özellikle bebeklerde zeka geriliğine sebep olur. Bu nedenle fenilalanin içeriği çok az olan gıdalarla beslenmeleri gerekir [60]. Aspartamın özellikle monosodyum glutamat içeren gıdalarla birlikte alındığında aspartat ve glutamatın birleşerek plazma konsantrasyonunu yükselteceği, bunun da beyin lezyonları yönünden risk oluşturabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, neonatal farelerde beyin lezyonları ancak aşırı yüksek glutamat veya aspartat dozları ile oluşturulabilmiş; insanlar üzerinde yapılan birçok metabolizma çalışması, bir insanın daima Aspartam içeren ürünler tüketmesi, hatta bunu monosodyum glutamat ile birlikte alması halinde bile plazma aspartat/glutamat/aspartat+glutamat konsantrasyonunun neonatal farelerdeki toksisite görülen konsantrasyona kadar ulaştırabilmesinin olanaksız olduğunu göstermiştir.

Aspartamın bileşiminde fenilalaninin beyin fonksiyonlarını değiştirebileceği, sonuçta baş ağrısı, konvülsif (şok) nöbetler, davranış ve ruhsal durum değişiklikleri yapabileceği iddia edilmiştir. Erişkin insanlar üzerinde yapılan birçok metabolizma çalışması Aspartamın tipik tüketim düzeylerinden çok daha fazla verilmesinin (% 90 tüketim grubunun aldığından 100 katı) güvenli plazma fenilalanin konsantrasyonları ile sonuçlandığını, beyin kimyasında herhangi bir etki oluşturmadığını göstermiştir [61].

Kan metanol konsantrasyonlarında herhangi bir artış oluşturabilmek için ağız yolu ile en az 50 mg/kg Aspartam alınmalıdır. Yapılan bir çalışmada 200 mg/kg hap alımı ve 75 mg/kg/gün uzun süreli Aspartam dozlarında metanolün toksik metaboliti olan formatın kan konsantrasyonunda artış olmadığı saptanmıştır. Bu Aspartam dozları erişkin bir insanın %100 Aspartamla tatlandırılmış 28 litre meşrubatı hap olarak tüketmesine ve 6 ay boyunca günde 10 L %100 Aspartamla tatlandırılmış meşrubat

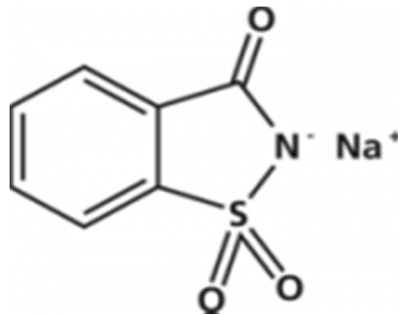
tüketmesine eş değerdir. Başka bir deyişle bir insanın kan format konsantrasyonunu toksik düzeylere çıkarmak için gerekli Aspartamı tüketebilmesi olanaksızdır [61].

Bununla birlikte, Rencüzoğulları ve ark. [29], 500, 1000 ve 2000 µg/ml Aspartam ile 24 ve 48 saat muamele edilen insan periferik lenfositlerinde Aspartamın KKD oluşumunu indüklediğini, fakat hem KA hem de MN sayısını artırdığını ve sitotoksik bir etkiye sahip olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar 50-2000 µg/petri dozlarında Aspartamın *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında mutajenik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Shephard ve ark. [28], Aspartamın nitrit ile muamele edilmesinden sonra oluşan nitroso-aspartam' ın *S. Typhimurium* TA98 ve TA100 suşlarında kuvvetli mutajenik etki gösterdiği, bu mutajenik etkinin TA98 suşuna oranla TA100 suşunda daha fazla görüldüğünü saptamışlardır. Aynı araştırmacılar mide ve ince bağırsakta dipeptid bileşiklerinin aynı şekilde nitrozlandığını ve bundan dolayı da daha fazla mutajenik etki gösterebildiklerini de ifade etmişlerdir.

3. 1. 3. Sakkarin (Saccarin)

Sakkarin 1879 yılında keşfedilmiş ilk kalorisiz yapay tatlandırıcıdır. Uzun yıllar tek başına veya diğer tatlandırıcılar ile birlikte kullanılmıştır. Halen 90' nın üzerindeki ülkede kullanımına izin verilmektedir [7].

Pek çok ülkede ticari olarak Resmen-Fahlberg işlemi ile üretilen Sakkarin, ABD' de Maumee işlemi ile üretilmektedir. Resmen-Fahlberg işleminde toluen, klorosulfonik asitle reaksiyona sokularak izomerik toluen – sulfoklorid oluşturulmakta, daha sonra amonyak varlığında 2-toluen sulfoklorid 2-toluensulfonik asitamid üretilmektedir. Söz konusu bileşik uygun koşullarda Sakkarine okside olmaktadır.



Şekil-4. Sakkarin' in Molekül Formülü

Maumee işleminde ise reaksiyon antranilik asit veya metil esteri ile başlamakta ve antranilik asit, sodyum nitrit varlığında diazonyum bileşiğini oluşturmaktadır. Söz konusu maddenin kükürt dioksit ile reaksiyona girmesi ve amonyakla reaksiyonu sonucunda Sakkarini oluşturacak olan 2-klorosulfonikbenzoik asit metil esteri üretilmektedir [61].

Sakkarin sakkaroz çözeltisinden 300 kat daha tatlıdır. Kimyasal ismi 1,2 benzisotiazolin-3-on-1,1-dioksit ($C_7H_5NO_3S$) olan Sakkarinin Cas Numarası: 128-44-9, beyaz, kristal yapıda, kokusuz bir tozudur. Erime noktası $228-230^{\circ}C$, sudaki çözünürlüğü $20^{\circ}C$ de 2 g/L, $100^{\circ}C$ de ise 40 g/L' dir. Sakkarinin sulu çözeltisi asidik karakterde olup, oda sıcaklığında doygün çözeltisinin pH' sı 2' dir. Alkali hidroksit veya karbonat çözeltilerinde Sakkarinin kolay çözündüğü ve tuzlarını oluşturduğu saptanmıştır [5]. Ticari olarak asit formu bilinen Sakkarinin gıda ve içecek formülasyonlarında genellikle tuzları kullanılmaktadır. En çok rastlanan tuzları sodyum ve kalsiyum olup, potasyum ve amonyum tuzları da bulunmaktadır [7]. Sodyum Sakkarinin sudaki çözünürlüğü Sakkarine göre daha yüksek olup, oda sıcaklığında 1000g/L, $100^{\circ}C$ de 3000g/L' dir. Kalsiyum sakkarinin ise oda sıcaklığında suda çözünürlüğü 370g/L, $100^{\circ}C$ de ise yine 3000g/L' dir [5].

Sakkarin kuru şartlarda stabil olan bir tatlandırıcıdır. Tadım sonrası ağızda bıraktığı acı ve metalik tat, Siklamat, Aspartam, Asesulfam K veya Sukraloz gibi tatlandırıcılarla birlikte kullanılarak maskelenebilir. Sakkarin aseton, etanol ve gliserolde çözünmekte, kloroform ve dietileterde ise oldukça az çözünmektedir.

Sakkarin kullanımının bazı avantajları;

1. Tatlılık gücünün yüksek olması (tatlılık derecesi %10' luk Sakkaroz çözeltisinde 200 kat daha fazladır)
2. Yüksek stabiliteye ve uzun raf ömrüne sahip olması
3. Diabetli hastalar için uygun olması
4. Kalorisinin düşük olması
5. Ürünlerde yaygın olarak kullanılabilmesi şeklinde sıralanabilir.

Sakkarinin ekstrem koşullarda da ($150^{\circ}C$ ve üstü sıcaklıklarda, pH 2 – 8 aralığında) stabilitesini koruyabilmesi nedeniyle unlu mamuller, salata sosları, reçeller, gazlı içecekler, meyve konsantreleri, konserve gıdalar ve diğer birçok gıdanın üretiminde kullanılabilir. Buna karsın pH 2' nin altında ve $380^{\circ}C$ sıcaklıkta hidrolize olarak

parçalanarak sakarinden tatlı tada sahip olmayan iki asit ortaya çıkmakta ve nitrojen oksit ve sülfür gibi toksik bileşikler oluşmaktadır [58, 62].

Özellikle Aspartam ve Siklamat ile birlikte yiyecek ve içecekler için geniş bir kullanım alanı olan Sakkarin daha çok diyet gıdalar, alkolsüz içecekler, sütlü tatlılar, kozmetik ve farmakolojik alanlarda kullanılmaktadır. Sakkarinin orta ve yüksek kullanım düzeylerinde tatlılığının yanı sıra metalik ve acımsı bir tat verdiği de saptanmıştır. Bu tadın maskelenmesi amacıyla tatlandırıcı karışımları önerilmiş ve en uygun karışımın 1:9 Sodyum sakkarin - Sodyum siklamat olduğu belirlenmiştir. Bu durumda tatlılığın arttığı ve Sakkarin acı tadının eşik seviyesinin altında kaldığı gözlenmiştir [7].

Wolf [63]' e göre ürüne 8g/100g Sakkaroz'a denk gelecek miktarda Sakkarin katıldığında tatlılık yoğunluğu azalır ve tadım sonrası Sakkarinin ağızda bıraktığı acı tat artar. Fakat Sakkarin siklamatla 1:10 oranında karıştırılıp kullanılırsa tadım sonrası izlenim azalır. Yoğurt gibi süt ürünlerinde Sakkaroz yerine Sakkarin kullanılabilir, ancak bu durumda aljinat, pektin veya karagen gibi hacim verici ajanların kullanılması gerekmektedir [58].

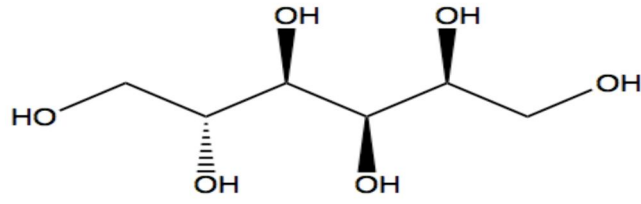
Wolff ve Rodin [13], Sodyum sakkarin' in insan lenfositleri ve chinese hamster ovary (CHO) hücrelerinde kardeş kromatid değişimini (KKD) indüklediğini, farelerde mesane kanserine sebep olduğunu dolayısıyla hem kanserojenik hem de mutajenik etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Renner [15], Chinese hamster kemik iliği hücrelerinde Sakkarinin KKD' yi indüklediğini bildirmiştir. Aynı şekilde, Moore ve Schmick [14], Sakkarinin *Saccharomyces cerevisiae*'da rekombinasyona sebep olduğunu (intergenik ve intragenik rekombinasyona) saptamışlardır. Ito ve ark. [64], da içme sularına 4 hafta boyunca günde %0.01 veya %0.05 oranında sodyum Sakkarin katılan erkek Fischer 344 sıçanların idrar keselerinde hafif neoplastik gelişime rastlandığını saptamışlardır. Squire [20], iki jenerasyon boyunca yiyeceklerine %1 Sodyum sakkarin katılan IRDC sıçanlarında mesane kanserine rastlanmadığını, sadece %6.25 ve %7.5 dozları verilen sıçanlarda hiperplasia oluşumu (aşırı büyüme) yanı sıra transisyonel (değişim gösteren) hücre karsinomunun oluştuğunu bildirmiştir.

Armstrong [19], epidemiyolojik çalışmalar sonucunda Sakkarinin insanlarda mesane kanseri oluşturmadığını fakat, sigara içmeyen ve Sakkarin kullanan kadınların yüksek risk altında olduklarını bildirmiştir. Dropkin ve ark. [65], Sakkarinin teratojenik

ve genotoksik etkilerini ICR albino farelerinde çalışmışlardır. Teratojenik etki için gebe farelere Sakkarin 3 farklı yol ile verilmiştir: Gebeliğin 10. gününde i.p. olarak 500, 1000, 2000 mg/kg, 5-15 günleri arasında gavaj yoluyla 5, 10, 25 mg/kg ve gebeliğin başlangıcından 17. güne kadar içme suyu ile %5, %10, %20' lik dozları. Bütün uygulamalarda teratojenik etkiye rastlanmadığı bildirilmiştir. Lamm ve ark. [66], mayozda tamir sistemi bozuk (repair deficient) erkek *Drosophila melanogaster* ile yaptıkları çalışmada Sakkarinin genotoksik olmadığını bildirmişlerdir. Durnev ve ark. [67], 5 gün boyunca oral yolla günlük 5 ve 50 mg/kg dozlarında Sakkarin verilen C57Bl/6 farelerinde KA' nin indüklenmediğini saptamışlardır. Jeffrey ve Williams [68], 2.5×10^{-2} , 5×10^{-2} , 1×10^{-1} ve 2×10^{-1} M dozlarında Sakkarinin F344 ve Sprague-Dawley sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını saptamışlardır. Bandyopadhyay ve ark. [69] Sakkarinin *S.typhimurium*' un TA97a ve TA100 suşlarında mutajenik olduğunu, 50, 100 ve 200 mg/kg b.w. verilen sıçanların kemik iliği hücrelerinde DNA kırılmalarını indüklediğini saptamışlardır. Turner ve ark. [70], diyetle verilen Sodyum sakkarinin Big Blue sıçanlarında karaciğer ve mesane kanserine sebep olmadığını bildirmişlerdir.

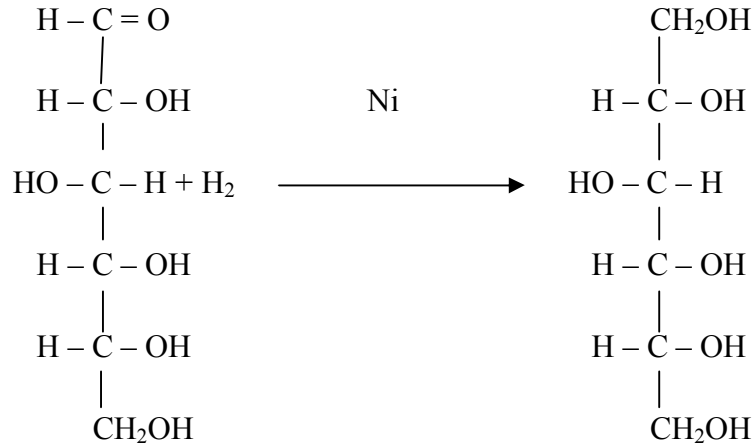
3. 1. 4. Sorbitol

Glucitol olarak da bilinen sorbitol (E420) 6 değerlik li (heksavalan) bir şeker alkolüdür. Sorbitol' ün Cas numarası: 50-70-4' dür. Kimyasal formülü $C_6H_{14}O_6$, molekül ağırlığı 182.17' dir. Glukoza en önemli üstünlüğü insüline gereksinim duymadan früktoz gibi metabolize olmasıdır. Vücutta “sorbitol dehidrojenaz” enzimi ile yıkılır ve hasarlı karaciğer tarafından bile glikojen şeklinde depolanabilir. Antikojen ve enerjizan etkileriyle proteinlerin vücutta tutulmasına yardımcı olur. İndirgeyici grup taşımadığı için amino asitlerle birlikte sterilize edildiğinde Maillard reaksiyonuna yol açmaz. Bu özelliğinden dolayı genellikle aminoasit solüsyonlarına katılır. Diyabetik hastalar tarafından tercih edilen düşük kalorili yapay bir tatlandırıcıdır.



Şekil-5. Sorbitol' ün Kimyasal Formülü

Türkmen [71]' nin aktardığına göre Sorbitol ilk kez 1872 yılında Fransız kimyacı Boussingault tarafından, kiraz ağacından ekstrakte edilmiştir. Endüstriyel olarak, glikozun katalitik hidrojenasyonu ile elde edilmektedir (Şekil-6) [72].



Şekil-6. Katalitik hidrojenasyon ile D-glikozdan, D-sorbitol oluşumu

Sorbitol vücutta emiliminden sonra dehidrogenaz enzimi ile okside olarak früktoza dönüşmekte, oluşan früktoz ise fruktojenaz enzimi ile früktoz-1-fosfata dönüşmektedir. Bu metabolit de karaciğerde aldolaz B enzimi ile dihidroksiasetonfosfat ve gliseraldehite parçalanmakta, dihidroksiasetonfosfat ise piruvat veya glikoz ve glikojene metabolize olmaktadır. Sorbitol in vitro ortamda DNA zararlarını indüklemektedir ve KA oluşumunda artırmaktadır [73]. Sorbitol ile ilgili çalışmalara çok fazla rastlanamamıştır.

3.2. Tatlandırıcıların Gıdalarda Kullanım Alanları

Gıdalarda kullanımına izin verilen tatlandırıcılar ile ilgili gerekli düzenlemeler 10 Eylül 1994 tarihinde AB resmi gazetesinde yayımlanan ve 1996 yılında 96/83/EC numaralı direktif ile son halini alan 94/35/EC numaralı Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Direktifi ile yapılmıştır. Bu direktifin ekinde son tüketiciye satılmasına ve gıdaların üretiminde kullanılmasına izin verilen 19 adet tatlandırıcının listesi yer almaktadır. Bu listede ayrıca tatlandırıcıların izin verilen kullanım alanları ve izin verilen maksimum miktarları da verilmiştir [74].

Ülkemizde ise 94/35/EC sayılı “Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar“ Konsey direktifi dikkate alınarak Avrupa Birliği’ ne uyum çerçevesinde “Gıdalarda Kullanılan Tatlandırıcılar Tebliği” hazırlanmış ve son olarak yapılan değişikliklerle 21.09.2006 tarihinde 2006/45 tebliğ numarasıyla yayımlanmıştır. Hazırlanan bu tebliğde amaç, gıda maddelerini tatlandırmak amacıyla kullanılan ve tüketiciye doğrudan sunulan tatlandırıcıların, gıda maddelerindeki kullanımını, ambalajlama ve etiketleme ile ilgili özelliklerini belirlemektir [75].

Bu tebliğde tatlandırıcıların kullanımı ile ilgili hükümlerden bazıları şu şekildedir [75];

- Enerjisi azaltılmış gıda üretiminde diğ çürümelerine neden olmayan gıda maddeleri veya şeker ilavesiz gıdalarda, raf ömrünü uzatmak amacıyla ve diyet ürünlerin üretiminde şeker yerine tatlandırıcı kullanılır.
- Gıda maddelerinin üretiminde kullanılacak veya tüketiciye direkt sunulacak tatlandırıcılar, sadece bu tebliğ ekinde yer alan tatlandırıcılar olmalıdır.
- Gıdaların üretiminde kullanılacak olan tatlandırıcılar sadece bu tebliğ eklerinde belirtilen koşullar altında kullanılabilir.
- Aksine bir hüküm belirtilmedikçe, sağlık sorunu olan bebek ve küçük çocuk gıdaları da dahil olmak üzere Türk Gıda Kodeksi-Özel Beslenme Amaçlı Gıdalar Tebliğinde yer alan bebek ve küçük çocuk gıdalarında tatlandırıcı madde kullanılamaz.

Tatlandırıcılarla ilgili SCF’ nin görüşleri alınarak, 89/107/EC sayılı direktif uyarınca 28 Temmuz 1995 tarihinde gıdalarda kullanımına izin verilen tatlandırıcıların saflık kriterleri ile ilgili 95/31/EC numaralı Avrupa Parlamentosu ve Konseyi Direktifi AB

resmi gazetesinde yayımlanmıştır. Bu direktif, 1998, 2000 ve 2001 yıllarında yapılan değişiklikler ile son halini almıştır. Söz konusu direktifte belli başlıklar altında tatlandırıcıların fiziksel, kimyasal ve saflık özellikleri verilmiştir [74].

Tatlandırıcılar birçok gıda ve içecek üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tatlandırıcıların kullanıldığı ürün grupları; alkolsüz içecekler, meyve suları, tatlılar, dondurmalar, reçel ve marmelatlar, şekerleme ve cikletler, unlu mamüller ve süt ürünleri olarak sıralanabilmektedir. Son yıllarda ağız gargaraları ve diş macunlarında da tatlandırıcılar yaygın olarak kullanılmaktadır [76].

4. DNA HASARI

Genetik bilgiyi taşıyarak, nesilden nesile aktarılmasını sağlayan DNA üzerinde sürekli olarak hasar oluşmaktadır. Oluşan hasar DNA onarım sistemleri tarafından onarılmakla birlikte, hasarın çok fazla olduğu veya onarım sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda DNA üzerinde oluşan hasar hücre ölümüne veya mutasyona neden olur [77]. Her bir insan hücresinin DNA' sında günde yaklaşık olarak 104 adet kodlanmayan veya yanlış kodlamaya neden olan hasar meydana gelmektedir [78]. DNA hasarının çeşitli hastalıkların etiyolojisinde ve yaşlanmada önemli rol oynadığı ileri sürülmektedir. Mitokondrial DNA' da nokta mutasyonlarının birikiminin yaşa bağlı olarak arttığı, bu nedenle özellikle mitokondrideki oksidatif DNA hasarının yaşlanma ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir [79].

Mutasyon genetik materyaldeki kalıtsal değişikliklerdir. Bu değişiklikler gamet hücrelerinde ya da somatik hücrelerde olabilir. Gamet hücrelerindeki, sonraki nesillere aktarıldığı için, somatik hücrelerdeki, kansere neden olabildiği için önemlidir. Normal bir insan hücresinde replikasyon esnasında meydana gelen hata (DNA polimerazın yanlış nükleotid yerleştirmesi) oranı 10^{-10} , hata okuma (proofreading) mekanizmasına rağmen ortaya çıkan hata oranı 10^{-8} dir [80].

4.1. Mutasyonlar

Mutasyonlar DNA hasarını ve genetik değişiklikleri içerirler. Bu değişiklikler, bir veya birkaç DNA baz çiftindeki değişimlerin oluşturduğu gen mutasyonları, kromozomal aberasyonlar gibi kromozomal yapı değişiklikleri ya da anöploidi-poliploidi gibi büyük sayısal değişiklikler şeklinde olabilir. Mutasyona neden olan etkenlere ise mutajen denir. Kromozomal aberasyonlara neden olan ajanlara klastojen,

anöploidiye neden olanlara anojen denir. Mutasyon, kimyasallara veya radyasyona normalden daha fazla dozda ve yoğunlukta maruz kalınması ve DNA ile etkileşme sonucu gerçekleşir ve bir toksisite çeşiti olarak kabul edilir. Dolayısı ile mutasyon, genotoksik etki olarak da adlandırılır.

Genetik materyalde meydana gelebilen mutasyonları üç ayrı grupta ele alabiliriz:

- 1) Genom mutasyonları
- 2) Kromozom mutasyonları
- 3) Gen içi mutasyonları

1) Genom mutasyonları: kromozomların sayısal anomalisinden oluşur. Bu hatalara yol açan üç farklı mekanizma vardır. Mitotik veya mayotik bölünmenin anafaz evresinde birbirinden ayrılması gereken kromozomların aynı anda, beraber hareket etmesi “nondisjunction (ayrılmama)” olarak bilinir. Normal bir gamet ile fertilizasyon sonucu ortaya çıkan zigotun trizomik (üç kromozom) veya monozomik (tek bir kromozom) olması nondisjunction sonucudur. Sayısal anomalilere neden olan ikinci bir mekanizma ise “anafaz lag” sonucu kromozom kayıplarıdır. Bir kromozomun kaybı sonucu hücreler mozaik bir yapıya sahip olur. Bir grup hücre normal kromozom sayısını taşıırken (öplöid) diğer hücre grubu monozomiktir. Üçüncü bir mekanizma poliploidi olarak adlandırılır. Bu durumdaki sayısal hatalarda, hücrelerde tüm bir genomun kendi katsayıları vardır. İnsanlarda triploidi ($3n=69$) gözlenebilir [81].

2) Kromozom mutasyonları: kromozomların yapısal anomalilerini oluşturur. Yapısal değişiklik tek bir kromozomu içerebilir (intrakromozomal). Intrakromozomal hatalar arasında; parasentrik ve perisentrik inversiyonlar, ring (halka) kromozomlar, izokromozomlar sayılabilir. Sentrik füzyon ve resiprokal translokasyonlar ise belli başlı interkromozomal anomalilerdir. Kromozomal aberasyona neden olan ajanlar için klastojen denir [81].

3) Gen içi mutasyonlar: karyotip analizi ile saptanamayacak ölçüde; DNA üzerinde baz düzeyindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlara neden olan üç farklı mekanizma vardır. Bunlar; baz değişimleri, delesyon (baz kaybı) ve insersiyon (baz eklenmesi) dur. Baz değişimleri, transisyon ya da transversiyon şeklinde olur. Transisyon bir pürin bazının diğer bir pürin bazı ile veya bir primidin bazının diğer bir primidin bazı ile yer değiştirmesi sonucu oluşur. Transversiyon ise bir pürin bazı yerine

primidin bazı veya pirimidin bazı yerine pürin bazı gelmesidir. Transisyon veya transversiyon sonucunda yanlış anlamlı (missense) veya anlamsız (nonsense) mutasyonlar ortaya çıkar [81,82].

Tek baz seviyesinde delesyon ya da insersiyonlar genetik kodun okunmasında çerçeve kayması (frameshift) adı verilen mutasyonlara neden olurlar. “Splicing” mutasyonlar mRNA’ nın işleme hatalarına yol açar. Kromozom anomalilerinin neden olduğu veya tek geni etkileyen Mendeliyan mutasyonlar çok iyi tanımlanmıştır. Mendel kurallarına göre geçiş gösteren hastalıklar otozomal dominant ya da X’ e bağlı resesif/dominant olarak sınıflandırılırlar. Gen seviyesindeki mutasyonların tespit edilebilmesi için moleküler genetik çalışmalara ve rekombinant DNA teknolojisinin yöntemlerine gereksinim vardır [82]. Mutasyonlar ayrıca; somatik ve genetik mutasyonlar olarak ikiye ayrılır: Somatik mutasyonlar; üreme hücreleri dışındaki diğer vücut hücrelerinde oluşan mutasyonlardır. Çoğunlukla organizmanın yalnızca bir kesiminde görülür. Somatik mutasyon kanser oluşumuna zemin hazırlaması yönünden son derece önemlidir. Genetik mutasyonlar ise; kuşaktan kuşağa geçirilebilen ve yalnızca üreme hücrelerinde oluşan mutasyonlardır [82].

4.2. Genotoksisite ve Değerlendirme Yöntemleri

Genotoksisite, DNA’ da yapısal değişiklikler oluşturarak ya da DNA sarmalında kırılmalara yol açarak meydana gelen mutasyonlardır. Genel anlamıyla genotoksisite hücre DNA’ sında hasara yol açabilen her türlü ajan için kullanılabilen bir terimdir [83]. Esasen DNA yapısında değişiklikler oluşturabilen ya da kırıklara neden olabilen çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların bu yolla oluşturdukları hücresel disfonksiyonları kapsar. Bu mutasyonlar sıklıkla kanser gibi çeşitli bozukluk ve hastalıklara eşlik eder. Mutasyonun bir toksisite türü olarak algılanması kimyasallara veya radyasyona normalden daha fazla dozda ve çeşitlilikte yoğun bir şekilde maruz kalınması ve DNA ile etkileşme sonucu gerçekleşir. Bu yönüyle mutasyon, genotoksik etki olarak da adlandırılabilir [84,85]. Genotoksik etki iki kategoride sınıflandırılabilir [84,86].

1. Mikrolezyonlar

- Baz çifti değişimi
- Çerçeve kayması

2. Makrolezyonlar

- Sayısal makrolezyonlar
- Yapısal makrolezyonlar

Mikrolezyonlar, nükleotid düzeyindeki hasarlar olup baz değişimi ve çerçeve kayması tipi mutasyonlar olarak iki grupta incelenir. Mikrolezyonları gözle görmek mümkün değilken, makrolezyonlar sitolojik analizlerle gözlenebilen kromozomal düzeydeki hasarlardır. Makrolezyonlar, kromozomlardaki sayısal ve yapısal değişiklikler olmak üzere iki grup altında incelenirler. Sayısal değişiklikler kromozom sayısındaki artmalar ya da azalmalar olarak gözlenirken, yapısal değişiklikler kromozomal aberasyonlar olarak adlandırılır. Kromozomlarda yapısal değişikliklere neden olan etkenlere ise “klastojen” denir. Bazı durumlarda bireyin, ksenobiyotiklerin metabolizması ya da detoksifikasyonu bakımından genetik polimorfizm göstermesi, spesifik toksik maddelere maruz kalınması durumunda mevcut riskin artmasına neden olur. Toksik maddelere maruz kalmanın ise DNA hasarına, DNA onarımında anormalliklere ve genetik dayanıksızlığa ve bu şekilde karsinogenezise neden olması beklenir. Kanser terimi tek bir hastalık olmayıp, temel nedeni kontrolsüz büyüme olan malign tümörlerin tümüne verilen bir addır. Hücre çoğalması sonucunda bir kitle halini alan tümör (neoplazma) kendisini çevreleyen komşu hücrelere de saldırır ve hastalığın sonraki evrelerinde tüm vücudu sarar. Hücresel çoğalma ve büyüme gen kontrolü altında olduğundan, genetik faktörler tüm kanserler üzerinde etkilidir. Mutasyon, genetik materyalde genellikle tek bir gende meydana gelen sürekli değişiklik iken, kanser ise kontrol edilemeyen lokal hücre bölünmesidir [85].

Mutajenezis ile karsinogenezis arasında güçlü bir ilişki vardır ve bu ilişkinin anlaşılmasıyla memelilerde tümör oluşumunun nedenleri de açıklık kazanmaktadır. DNA hasarının indüklenmesi, bunun sonucunda da mutasyonların ve kromozomal bozuklukların meydana gelmesi kanser oluşumundaki başlıca mekanizma olarak kabul edilmektedir [87].

Kimyasal maddelerin kanser oluşturmasında;

- Mutasyon ve DNA onarımı yanı sıra, ikinci bir etkenin hücresel çoğalmayı uyarması,
- T lenfositlerinin baskılanması sonucunda bu T lenfositlerinin vücutta doğal olarak gelişen kanser hücrelerini yok etme fonksiyonlarının bozulması
- Normal hücre çoğalmasına katkıda bulunan büyüme faktörlerinin ve mitozda rol oynayan diğer etkenlerin sentezini kontrol eden genlerin aktive edilmesi gibi mekanizmalar rol oynar.

Fiziksel veya kimyasal mutajenlerden birisiyle karşılaşan hücrelerde kromozom enine olarak bir veya birkaç noktadan kopar. Kopmalar genellikle kromozomların tek iplik halinde görüldükleri interfaz veya erken profaz safhalarında meydana gelir. Bu durumda her bir kromatidinde de kopma olan kromozomun serbest kalan uçları birlesir (sister union). Sonuçta disentrik (iki sentromer içeren) ve asentrik (sentromer içermeyen) yapılar meydana gelir. Asentrik kromatid parçası hücrede varlığını sürdüremez kaybolur. Anafaz safhasında disentrik kromatid iki kutup arasında bir köprü gibi gerilir ve kopar [88-90]. Metafaz evresinde ise; genellikle kardeş kromatidlerden birinde kopma görülür. Bu kopmalar kromozomlarda farklı tipte yapısal değişmelere neden olur [88-90].

4.3. DNA Hasarı ve Biyogöstergeler

İnsanlar ve diğer canlılar, kaçınılmaz bir şekilde çeşitli genotoksinlere maruz kalmaktadırlar. Genotoksik maruziyet endojen ve ekzojen mutajenlerden, mesleki maruziyetten, diyetten, yaşam tarzından, radyasyondan ve tıbbi prosedürlerden kaynaklanabilmektedir [91]. Herhangi bir sebeple DNA’ da oluşan lezyonlar tamir edilemediği takdirde hatalı replikasyonlar, mutasyonlar, bireyin kanser dahil birçok hastalığa karşı artan duyarlılığı ve birtakım dejeneratif hastalıklar gibi oldukça ciddi sonuçlar doğurabilmektedir [92]. Genetik kararsızlık terimi, normal bir hücrenin kararlı (stabil) genomunun bir tümörün kararsız (unstabil) genom karakteristiklerine dönüşmesi için gerekli olan çeşitli değişimlerin birikimi ile sonuçlanan olguyu tanımlayan bir terimdir. Bir başka deyişle, kanser hücrelerindeki genomik farklılaşma olaylarını açıklayan bir terimdir. İn vivo olarak tümör gelişimi üzerine yapılan çalışmaların

sonuçları, genetik kararsızlığın tümör oluşumundan önce meydana geldiğini, yani kanserin erken evrelerinde oluştuğunu kanıtlamıştır [93,94].

DNA hasarının kromozomal düzeyde çalışılması genetik toksikolojinin vazgeçilmez bir parçasıdır. Çünkü kromozomal mutasyon, karsinogenezde oldukça önemli bir olaydır. Kanser insidansını belirleyen etkenlerin büyük çoğunluğu çevresel etmenlerden kaynaklanmaktadır. İnsan biyoizlemesi, bazı çevresel faktörlere maruz kalmaktan kaynaklanabilecek potansiyel riskleri belirlemek ve hesaplamak için kullanılan bir araçtır [95,96].

Biyozileme özellikle kanser risk değerlendirmesi ve hastalıkların tedavisi alanında giderek artan bir ilgi görmektedir. Biyogösterge ise genotoksik bir ajanla biyolojik sistem arasındaki etkileşimin spesifik ölçümlerini ifade eden bir terimdir [91]. Biyogöstergeler, insan dokuları, hücreleri ve sıvıları gibi biyolojik materyallerde ölçülebilir nitelikteki hücresel, biyokimyasal veya moleküler değişimlerdir [97].

Kanser riskini tahmin edebilme açısından geçerliliği gösterilmiş olan biyogöstergeler, kanser riskinin zamanında belirlenebilmesi, hastalığın önlenmesi ve kontrolü amacıyla kullanılabilirler [98]. Biyogöstergeler 3 sınıfta incelenmektedir:

4.3.1. Maruziyet Biyogöstergesi

Gözlenen cevapta bir ajana maruziyetin rol oynayıp oynamadığını belirlemek amacıyla bileşiğin kendisinin veya metabolitlerinin makromoleküllerle oluşturduğu ürünlerin ya da bileşiğin spesifik metabolitlerinin direkt ölçümünü içerir [99,100].

4.3.2. Etkinin Biyogöstergesi

Bir organizmadaki ölçülebilir biyokimyasal, fizyolojik, davranışsal veya diğer değişimlerdir. Etkinin biyogöstergesi, hastalıkların, karsinogenezin ve toksisitenin gelişimi sırasında erken uyarılar sağlar. Göstergeler, devam etmekte olan olaylar dizisinde, maruziyetten en son etki görülene kadar, herhangi bir zamanda ölçülebilir. Varlıkları hastalık için belirgin artmış bir riskin göstergesi olarak algılanabilmektedir [99, 101].

4.3.3. Duyarlılığın Biyogöstergesi

Genetik bir yatkınlığın tespitini mümkün kılmaktadır. Bu sayede genel popülasyona oranla hastalıklara karşı daha yüksek risk altındaki özel bireylerin tespitini sağlayabilmektedirler. Spesifik kimyasalların aktivasyonu veya detoksifikasyonunda rol oynayan enzimlerin aktivitelerini ya da özel hasar tipindeki DNA onarım kapasitelerinin ölçümelerini de içermektedirler [99].

Kanserin gelişimi birkaç yıldan onlarca yıla kadar sürebileceğinden bu denli uzun bir zaman periyodu için prospektif epidemiyolojik çalışmalar yapmak her zaman pratik olmamaktadır. [94, 98].

Çizelge 1.' den da anlaşılacağı gibi DNA hasarını gösterebilecek birçok biyogösterge vardır. Ancak kanserin erken teşhisi açısından bu biyogöstergelerin önemleri daha tam olarak bilinmemektedir [102].

Çizelge 1. İnsan hücrelerinde in vivo veya in vitro çalışılmakta olan DNA hasarı biyogöstergelerinden bazıları [102].

DNA Hasarı Biyogöstergeleri
DNA kolu kırıkları (örn. SCGE-Comet testi)
Kromozomal aberasyonlar
Mikroçekirdek testi
Anöploidi
Telomer kısalması
Apürinik alanlar
DNA katım ürünleri
DNA oksidasyonu
DNA metilasyonu
Nükleer p53
Nokta mutasyon testi (HPRT)
Mitokondriyal DNA mutasyonu
Üreme hücrelerindeki DNA hasarı

Kromozom hasar oranındaki rastgele bir artışın kanser için bir risk faktörü olması şaşırtıcı bir sonuç değildir. Öyle ki, bilinen karsinogenlerin büyük bir çoğunluğu kromozom kırıklarına yol açmakta veya anöploidileri indüklemektedir. Eğer kanser hücrelerinin gelişimi mutasyonlarla besleniyorsa, bu durumda mutasyon oranındaki artış ve daha da önemlisi hipermutabl hücrelerin sayısındaki artış kanser riskinin artmasına yol açacaktır [94, 96]. DNA’ daki farklı mutasyonlar farklı sonuçları doğurmaktadır. Kromozom kırıkları ve anöploidinin, kanserin prokürsörü olarak düşünülen hipermutabl duruma yol açmakta olduğu giderek yaygınlaşan bir görüştür. DNA’ daki çift sarmal kırıkları kanser hücrelerinde ortak olarak gözlenen kromozom translokasyonları veya yeniden düzenlemelere yol açmaktadır. Disentrik kromozomun oluşumu ise; bölünen hücrede oldukça şüpheli bir durumdur çünkü anafazda bu iki sentromer genellikle zıt kutuplara çekilerek disentrik kromozomun eşit olmayan bir şekilde bölünmesine yol açacak nükleoplazmik köprülerin oluşumuna neden olmaktadır [103]. Bunun sonucunda gen amplifikasyonu (GA) ve daha fazla köprü, kırılma, füzyon döngüleri oluşarak hipermutabl sürece girilmiş olur.

4.4. Biyogöstergelerin Önemi

1. Maruz kalman kimyasallar ile organizma arasında gerçekleşen etkileşimleri saptayabilir ve öldürücü olan düzeye kadar bu etkilerin ölçülmesini sağlayabilirler.
2. Biyogöstergeler sayesinde, kontaminantların oluşturduğu advers etkiler hakkında bilgi sahibi olunabilir.
3. Öldürücü düzeyin altında olan etkilerin erken teşhisi uyarı olarak görülüp, durumun düzeltilmesi veya koruyucu önlemlerin alınmasına yardımcı olurlar.
4. Biyogöstergeler yardımıyla, bölgesel ve kısa dönemli biyolojik kirlilik düzeyi saptanabilir.
5. Çevresel kirleticilere maruziyet ve bundan kaynaklanabilecek risk hakkında bilgi verirler.
6. Kirliliğin şiddetine bağlı ekosistemde oluşan değişimleri gösterebilirler.
7. Yol gösterici olarak kullanılabilir, geri dönülmez çevresel hasara bağlı ekolojik sonuçlar doğmadan biyolojik düzeltme stratejilerinin geliştirilmesini sağlayabilirler.
8. Laboratuarlarda yapılan toksisite analizleri, kimyasal ve atıkların toksisiteleri hakkında göreceli bilgi vermektedir.

9. PAH' lar ve organofosfatlar gibi, metaboliti etkin olan kimyasallara maruziyet ile oluşacak toksik etki arasında ilişki kurulmasını sağlayabilirler.
10. Biyogöstergeler, birçok PCB türünün, PAH' ların ve metallerin toksikolojik etkileşimleriyle ortaya çıkan kümülatif etkilerini, belirli bir organ, doku veya moleküler düzeyde ortaya koyabilirler.
11. Ölçümün tek kimyasal üzerinde yapılması ve kontaminantın değişik dozlarının saptanabilmesi sayesinde, uzun dönem ekolojik etkileri, kısa dönem çalışmalar ile gösterebilmektedir [81].

5. COMET TEKNİĞİ (SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS – SCGE)

Sitogenetik yöntemler, mutajenik ve karsinogenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Son yıllarda gelişen comet analizi de çeşitli tipte DNA hasarlarının tespiti için hassas, hızlı ve güvenilir bir yöntem olması nedeniyle yaygın kullanım görmektedir [86].

5.1.Tarihçesi

Tek hücre jel elektroforez yöntemi ilk kez 1984 yılında Ostling ve Johanson [104] tarafından DNA hasarını görüntülemek amacıyla geliştirilmiştir. Geliştirilen bu tekniğe göre hücreler mikroskobik lamalar üzerindeki agaroz jele gömülür, tuz deterjan içeren çözeltilerle muamele edilip lizise uğratılmakta ve nötral şartlarda elektroforez yapılarak, DNA serbestleştirilmektedir. Elektrik akımı uygulaması, kırılmış ve hafiflemiş DNA fragmentlerinin, çekirdekten hızlı göçünü sağlamaktadır. Özellikle DSB artmış hücrelerde, kırık DNA' nın katottan anoda göçü floresans bir boya ile boyanarak görüntülenmektedir. Görünüşleri itibarıyla kuyruklu yıldız benzediklerinden comet diye adlandırılan bu görüntüler ölçülüp değerlendirilmektedir [87].

DNA çift sarmal kırılmalarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırılmalarının belirlenmesine izin vermemektedir. Ayrıca, DNA' da hasar oluşturan çoğu ajan DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı daha sonra Singh ve arkadaşları [84] ile Olive ve arkadaşları tarafından [105], alkali şartlarda (pH>13) elektroforeze dayalı mikrojel tekniği tanımlanmıştır. Olive ve arkadaşları da bundan iki yıl sonra bu tekniğin başka bir alkali versiyonunu (pH>12.3) geliştirmişlerdir. Daha sonraki yıllarda Collins

ve arkadaşları ile Singh ve arkadaşları tarafından modifiye protokoller geliştirilmiştir [86, 106, 107].

Kullanılan daha güçlü liziz koşulları, proteinlerin %95' inden fazlasını yok edebilmektedir. Alkali elektroforez uygulaması ile alkali labil bölgelerin ve tek zincir kırıklarının basit ve duyarlı bir şekilde tanınması sağlanmıştır. Pek çok genotoksik ajanın çift zincir kırıklarından çok, tek zincir kırıkları ve alkali labil bölgeler oluşturması nedeniyle metodun bu versiyonu daha çok önerilir hale gelmiştir [107, 108].

Böylelikle comet tekniğinin yeni dizaynı, insan hücrelerinin hemen hepsinde DNA hasarı büyüklüğünün direkt olarak tespitini sağlamaktadır. Bunun yanında DNA hasar tespiti ve onarım mekanizması çalışmalarında da kullanılabilmektedir [87, 105].

Geleneksel alkali comet protokolünden ayrı olarak lezyon spesifik endonükleazların kullanıldığı modifiye protokoller de vardır. Standart alkali comet yöntemi zincir kırıklarını ve alkali labil bölgeleri belirler. Alkali labil bölgeler apürinik/apirimidinik alanları temsil eder ve bu durum hasarlanmış ya da kayıp bazlardan kaynaklanır. AP bölgeleri, BER esnasında oluşan ara ürünlerdir ve bazlarda ya da şekerlerde kendiliğinden meydana gelir ve kimyasal kararlılığın değişimiyle sonuçlanır. pH>13 şartlarında AP bölgelerin yanı sıra okside bazlar da oluşur. Okside bazların varlığı comet yöntemiyle kolaylıkla saptanabilir. Bunun için endonükleazların kullanıldığı ilave bir basamak gerekir. Lizizden sonra, agaroz gömülü hücreler lezyon spesifik endonükleazlarla muamele edilir. Formamidopirimidin (FPG), okside pürin 8-oksoguanini tanır ve halkası açılmış pürinleri, Endonükleaz III ise okside pirimidinleri zincir kırığına çevirir. Özellikle FPG ile modifiye edilmiş Comet protokolü, insan hücrelerindeki bazal 8-okso guanin seviyesinin belirlenmesinde kullanılır. FPG ayrıca alkilasyon hasarlarını da tanıyabilmektedir. Bunların dışında T4 pirimidin dimer glikozilas; siklobütan pirimidin dimerlerini zincir kırığına çevirir. Bu özelliğinden dolayı UV ışığın verdiği DNA hasarını belirlemede etkilidir. Urasil DNA glikozilas ise folat eksikliğinden kaynaklanan yanlış birleşmiş urasilleri tanır ve zincir kırığına çevirir [109].

5.2 Comet Metodunun Kullanım Alanları

Comet tekniği tek bir hücrede DNA hasarının direkt tayininin yanı sıra, bir popülasyondaki tüm hücrelerin aynı oranda hasara uğrayıp uğramadığının tespitine, dolayısıyla da bir tedavi sırasında hücrelerin cevabının (özellikle radyoterapi ve kemoterapide) saptanmasına yardımcı olabilmekte, dirençli hücre popülasyonunun tanımlanmasını sağlamaktadır. Comet tekniği; değişik deneysel şartlarda DNA hasar ve onarımını incelediğinden, son yıllarda genotoksisite ve DNA onarım mekanizmalarının incelenmesinde kullanımı artan bir yöntemdir [110, 111].

İnsan popülasyonlarının genetik bütünlüğü, kimyasal ve fiziksel genotoksinlere maruz kalmayla sonuçlanan endüstriyel etkinliklerden dolayı giderek artan bir tehdit altındadır. Genetik hasarı etkileyen diğerk faktörler ise yaşam biçimi, çeşitli ilaçlarla uygulanan tedaviler ve iklim değişiklikleridir.

Genlere hasar veren ajanların etkilerini ortaya koymak için kolay test yöntemleri aranmıştır. Sitogenetik yöntemler mutajenik ve karsinojenik bileşiklere maruz kalan toplulukların biyolojik izlenmesinde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Metabolizma ürünleri mutajen ve karsinojen olabileceğinden ayrıca çeşitli örneklerde biyotransformasyonları farklı olduğundan inhalasyon ajanları veya diğerk potansiyel mutajenik ajanlar için kullanılacak testler insan hücrelerinin analizi şeklinde olmalıdır [112]. Biyoizleme çalışmalarında giderek artan şekilde sitolojik yöntemler kullanılmaktadır. İnsan çalışmalarında sitogenetik olarak gelinen son aşamalardan biri de insan lenfositlerinin incelenmesidir [113,114]

Günümüzde comet tekniği insan popülasyonlarından alınan lenfosit örneklerinde oksidatif hasar, UV ve iyonizan radyasyona duyarlılıkların incelenmesi yönünden başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Özellikle biyoizleme (human biomonitoring) çalışmalarında, meslekleri nedeniyle ya da kazayla çeşitli kimyasal maddelere maruz kalan kişilerde, DNA hasarının incelenmesinde son yıllarda rağbet gören bir tekniktir [110,115]. Genotoksik taramalarda comet yöntemi giderek daha fazla kabul görmektedir. Comet yönteminin, yaşlanmadan, genetik toksikoloji ve moleküler epidemiyolojiye kadar pek çok toksikoloji alanında uygulamaları vardır [116].

Comet tekniği genotoksik ajanların oluşturduğu DNA hasarının tespitinde yaygın olarak kullanılan hassas bir yöntemdir. Comet tekniği ile bilinen genotoksik ve mutajenik ajanların spesifik aktiviteleri çalışılabildiğı gibi genotoksisitesi bilinmeyen

kimyasalların araştırılması da yapılabilmektedir [117, 118]. Alkali comet tekniği ile direkt DNA üzerine etki yapan mutajenlerin oluşturduğu DNA hasarlarını tespit edilebilmektedir [119, 120]. Çeşitli mutajenik ve karsinojenik ajanların etkileri (Örn. sigara, alkol, dumansız tütün vs. gibi) popülasyon düzeyinde araştırılırken yeni popülasyon biyo izlemesi çalışmaları yapılırken kullanılan teknikler arasında comet yönteminin en çok tercih edilen teknik olduğu gözlemlenmektedir [113, 121-124].

5.2.1. Çevre Sağlığını Tespit Etmede

Özellikle, trafik ve fabrika atıklarının çevreye verdiği zarar, kimyasal atıklar, zehirli gazlar vb. gibi bir çok durumda DNA hasarının olduğu kanıtlanmıştır. Ancak bu etkilerin moleküler düzeyde etkileri ve yol açtıkları hasar dereceleri daha iyi analiz edilmek durumundadır. Bu durumlarda çevre sağlığı veya insan üzerinde oluşan stresin etkisi kimi zaman indiktor bitki kullanarak kimi zaman da kobay hayvanlar kullanarak belirlenmiştir. Ancak strese maruz kalan organizmanın kendisinin incelenmesi daha akılcı bir yoldur [125].

Canlının bütün genetik bilgilerini DNA molekülü ihtiva ettiğinden DNA’ da meydana gelen olumsuz değişiklikler kendisinden sonra gelen nesillere aktarılan genetik bilgiyi de değiştirebilmektedir. İçinde bulunduğumuz ortamda meydana gelen olumsuzluklar, canlılara ait DNA moleküllerinde hasara, oluşan hasar tamir edilemediği takdirde kontrollü hücre ölümüne veya kansere kadar giden hastalıklara neden olabilmektedir. DNA hasarını oluşturan nedenlerin en başında, çevresel şartlar, sürekli artan sanayi ve teknolojik atıklar, egzoz dumanı, sigara gibi faktörler gelmektedir. Canlının her bir hücresinde günde on binlerce DNA molekülü hasara uğramakla birlikte oluşan hasar DNA tamir mekanizmaları ile tamir edilmektedir. Normalde hasar ve tamir denge halindedir. Denge hasar lehine bozulduğunda tamir mekanizmaları yetersiz kalmakta, neticede kontrollü hücre ölümü olarak nitelendirilen “Apoptozis”, veya mutasyon, delesyon insersiyon, kanser oluşumu gibi DNA molekülünde kalıcı değişiklikler oluşmaktadır. Bazı durumlarda ise stres faktörlerinin olumsuz etkileri ancak organizmanın hayat evresinin son aşamasında açığa çıkmaktadır. Dolayısı ile, organizmada kalıcı hücre hasarlarının oluşmadan önlenbilmesi için DNA’ nın durumu hakkında kaliteli bilgi veren bir test, kaliteli bir test olma özelliği taşıyacaktır. Bazı durumlarda ise bakteri veya fungus gibi stres etmenleri de konukçu organizmada strese neden olurken kendileri de strese maruz kalabilmektedirler. Böyle durumlarda ise mikroorganizmalar ya daha virulent olabilmekte ya da stres koşullarından bitkiler kadar

etkilenmemektedirler [126]. Bu gibi koşullarda tek hücre jel elektroforez metodu ile canlılar üzerinde olumsuz etki yaratan mikroorganizmaların moleküler düzeyde incelenmesi ile o mikroorganizmanın dayanıklılığı hakkında bilgi alınabilecektir.

5.2.2. Pestisit Çalışmalarında

Pestisitlerin birçok faydalarının yanı sıra, aşırı veya bilinçsiz kullanımı neticesinde insan, çevre ve hedef olmayan organizmalar üzerindeki negatif etkileri gözümüze çarpmakta, ancak etkileri genellikle kantitatif olarak belirlenmekte olup buna karşın toksisite dereceleri dayanıklılık mekanizmaları ile açıklanabilmektedir. Ayrıca “çevre dostu” olarak bilinen pestisitlerin çoğunun doğru miktarlarda ve uygun kullanım periyotlarında zarar oluşturmadığı şeklinde bilgiler verilmesine rağmen bu kimyasalların uzun kullanımının süresi içinde organizmada DNA hasarına yol açtığı ve dolayısı ile metabolizmayı etkilediği düşünülmektedir. Bu gibi durumlar comet analiz yöntemi ile hızlı ve güvenilir bir şekilde belirlenebilmektedir [127,128].

Ayrıca stres faktörlerinin etkilerinin azalması ile canlıların verdiği tepkiler de değişmekte ve dolayısı ile organizmada görülen iyileşmenin DNA düzeyinde olup olmadığının belirlenmesi, stresin kalıcı bir etki bırakıp bırakmadığının belirlenmesi açısından çok önemlidir.

Kısaca bu metot, bakteriler, funguslar, algler, teorik olarak tüm yüksek bitkiler, deniz canlıları, insanlar, böcekler, omurgalılar ve hayvanlar üzerinde çok rahat uygulanabilen onları hem çevre sağlığı açısından monitor etmede hem de hedef organizmaların savunma potansiyelleri ve gelecekteki sağlık durumları hakkında bilgi vermede kullanılan önemli bir metottur [129].

5. 3. Comet Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları

1. Az sayıda hücre gerektirir.
2. Değişik hücre ve doku gruplarına uygulanabilir.
3. Hassastır.
4. Kolay uygulanabilir.
5. Hızlıdır.
6. Ekonomiktir.
7. Güvenilirdir.
8. Çeşitli türlerde DNA hasarlarını tespit edebilir.
9. Tek hücre seviyesinde bilgi edinilebilir.

10. Endüstriyel toksikoloji, çevresel toksikoloji, genetik toksikoloji, insan biyoizlenimleri, DNA onarım ve hasarının temel mekanizması gibi çalışmalarda kullanılabilir [130, 131].

Yöntem in vivo modellerde herhangi bir dokuya da uyarlanabildiğinden, sadece hızlı çoğalan hücrelerde uygulanabilir olan diğer genotoksisite testlerinden daha üstündür. Aynı zamanda tek bir doku hasarını belirlemek de mümkündür [131].

Comet analizi, insan çalışmalarında kullanılabilecek en uygun testlerdendir. Çünkü radyoaktif maddelerle işaretleme gibi zararlı işlemleri içermez ve kolaylıkla görünebilir hücrelere uygulanabilir. Normalde sıklıkla kullanılan hücre grubu, beyaz kan hücreleridir. Bu hücreler rölatif olarak invaziv olmayan yollarla, kolaylıkla ayrılabilir ve metoda iyi uyum sağlarlar. Ancak kanser için hedef doku olmamaları ve beyaz kan hücrelerindeki hasarın gerçek hedef dokudaki hasarı yeterince yansıtmadığının net olmaması gibi dezavantajları da bulunmaktadır. Bazen cerrahi sonrası çıkarılan dokular kullanılabilmekle birlikte sağlıklı kontrol dokusu elde etmek oldukça güçtür. Yöntem bukkal ve üreteryal epitelyum hücrelerde denenmiştir ancak bu hücreler, yapıları nedeniyle ek proteaz kullanımını ve uzun bir lizis süresini gerektirirler [130]. Comet yöntemi için hazır ticari kitler kullanıma sunulmakla birlikte, halen manuel uygulamalar geçerliliğini korumaktadır. Fakat manual uygulamalar, yöntemi uygulayan kişiye doğrudan bağlı olduğu için kişisel performanstan fazlasıyla etkilenmektedir. Ayrıca comet tekniğinin farklı uygulanması da sonuçlarda farklılıklara sebep olmaktadır.

5.4. Comet Tekniğini Etkileyen Faktörler

Comet tekniğinin farklı uygulanması sonuçları etkilemektedir. Örneğin, elektroforez şartları (süre, uygulanan voltaj), lizis solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre ve pH), metodun hassasiyetini etkilemektedir. Bu nedenle deneylerde şartlar standart tutulmalıdır. Bugünkü mevcut şartlarda, çevresel ve fizyolojik değişikliklerin comet yönteminin varyasyonlarına katkısını tahmin etmek zordur. Sağlıklı ve tedavi almamış kişilerde DNA hasarında değişiklik oluşturan faktörler; yaş, hava kirliliği, diyet cinsiyet, sigara, güneş ışığına maruziyet, enfeksiyon ve meslek olarak sayılabilir [86].

5.5. Comet Yönteminde DNA Hasarının Değerlendirilmesi

Comet yönteminde hasarsız hücrelerin (lenfosit) incelemesinde yuvarlak, kenarları daha az yoğun olmak üzere ortası parlak bir ışık görünümü (çekirdek) vardır. Bu hücrelerin görünümü nonmigration (NM) olarak değerlendirilir. Eğer DNA hasarı oluşmaya başlamışsa, normalde düzgün kenarlı olan görüntü DNA kırıklarının çekirdek dışına göçünün de başlaması nedeni ile düzensiz kenarlı bir görünüm alır (stretch ya da yeni adı ile low migration). Hasar arttıkça lenfositler kuyruklu yıldız (comethigh migration) şeklini alırlar. Son aşama ise apoptozistir. Hasarın şiddetine göre merkezden kenara doğru uzama olur. Bu comet (kuyruk) uzunluğu hasar ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca kuyruktaki floresan yoğunluğu da hasarın derecesi ile paralellik gösterir [132],

Comet yönteminde lamaların değerlendirilmesi comet görüntü analiz sistemi (comet software) ile yapılabileceği gibi gözle değerlendirme gibi farklı yöntemlerden de yararlanılabilmektedir. Gözle değerlendirmede hücreler hasarlı ve hasarsız olarak ikiye ayrılırlar. Hasarlı hücreler ise hasar seviyelerine göre farklı kategorilere ayrılabilir. Bazı çalışmalarda hücreler; hasarsız, az hasarlı ve çok hasarlı olarak üç sınıfa ayrılabilirdiği gibi, Kobayashi ve arkadaşları hücreleri daha detaylı bir şekilde değerlendirerek 5 kategoriye ayırmışlardır [133-135]. Ayrıca mikroskobun okülerine yerleştirilen mikron seviyesinde ölçüm yapabilen bir cetvelden de yararlanılabilir [132].

Gözle değerlendirme; 5 dakikada 1000 hücre sayılabilecek kadar hızlı olduğundan ve bilgisayar programı gerektirmediğinden ucuz ve kolay bir yöntemdir. Bu konuda yapılan değerlendirmeler, gözle değerlendirmenin software kullanımı kadar etkili ve kullanılabilir olduğunu göstermektedir [136].

Hasarın değerlendirilmesinde “Tail Moment” denilen bir başka ölçüm yönteminden de yararlanılmaktadır. “Tail Moment” kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA oranı olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde “Tail Moment” kuyruktaki DNA yoğunluğunu göstermektedir [132].

Comet yöntemi pek çok tipte memeli hücresinde çeşitli ajanların indüklediği DNA hasarı ve onarım bozukluğunun saptanmasını amaçlayan in vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılmaktadır. DNA kırıklarının saptanması ilkesine dayanan bu yöntem, pekçok DNA hasarının ve onarımının saptanmasında biyoizlem çalışmalarında ve genetik toksikolojide yaygın olarak kullanılmaktadır [116].

DNA hasarının indüklendiği çalışmalar, comet yöntemi ile çeşitli hücre tiplerinde ve hedef organlardan alınan hücrelerde yapılabilmektedir. Comet yöntemi, duyarlılığı ve DNA hasarını tek hücre seviyesinde ölçmeye olanak sağlaması nedeniyle

genotoksik etkisi merak edilen bileşiklerin toksisitelerini hızlı olarak önceden belirlemede kullanılan bir yöntem olmuştur. Bu yöntem aynı zamanda DNA onarımının belirlenmesini amaçlayan çalışmalarda da uygulanmaktadır. Bu amaçla Gedik ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, hücreler önce DNA hasarı oluşturan kimyasal maddeye maruz bırakılmış daha sonra da onarım basamağı inhibe edilerek, onarımı gerçekleşemeyen bölgelerde oluşan kırıklar aracılığı ile hücresel onarım kapasitesi hakkında bilgi edinilmiştir [137].

Comet yöntemi, bazı patolojik koşulların ya da kimyasal maddelere terapötik olarak maruz kalmanın ardından oluşan sonuçların araştırılması amacıyla pek çok klinik çalışmaya uygulanmıştır. Bu çalışmaların sonucunda; kötü beslenme, parazitik enfeksiyonlar, diyabet, mesane kanseri, düşük yapma gibi etkenlerin DNA hasarını anlamlı olarak artırdığı bulunmuştur [138, 139].

Ayrıca radyoterapi ve/veya kemoterapi alan hastalarda, anestezi ilaçlara maruz kalanlarda, siklofosfamid ve sisplatin alan meme kanseri hastalarında bu yöntem ile anlamlı olarak artmış DNA hasarı saptanmıştır. Comet yöntemi ile yapılan çalışmalar sadece somatik hücrelerle sınırlı kalmamış, infertil olan ve olmayan erkeklerin spermalarında DNA hasarı araştırıldığında anlamlı bir artış bulunmamıştır [138].

Comet yönteminin düşük hasar seviyelerinde de duyarlı olduğu gösterildikten sonra, mesleki, yaşamsal ve çevresel maruziyetlerin biyoizlenmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Pestisitlere, benzene, anestezi gazlara, radyasyona ve sitirene maruz kalan bireylerde DNA hasarının arttığı gösterilmiştir. Ek olarak sigara içenlerde ve çocuklarda da DNA hasarını belirlemeye yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Hava kirliliğinin DNA hasarı yapıp yapmadığının araştırıldığı bir çalışmada ise lenfositlerin dışında, bukkal ve nazal epitel hücreleri çalışılmıştır [140].

Comet yöntemi ile DNA çapraz bağları da belirlenebilmektedir. Bu amaçla uygulanan yöntemin temel prensibi, DNA çapraz bağ sayısının artması sonucunda, DNA migrasyonunun engellenmesidir. Collins ve arkadaşlarının geliştirdiği bir diğer yöntem ise oksidatif DNA hasarının spesifik enzimler kullanılarak belirlenmesi olmuştur [141].

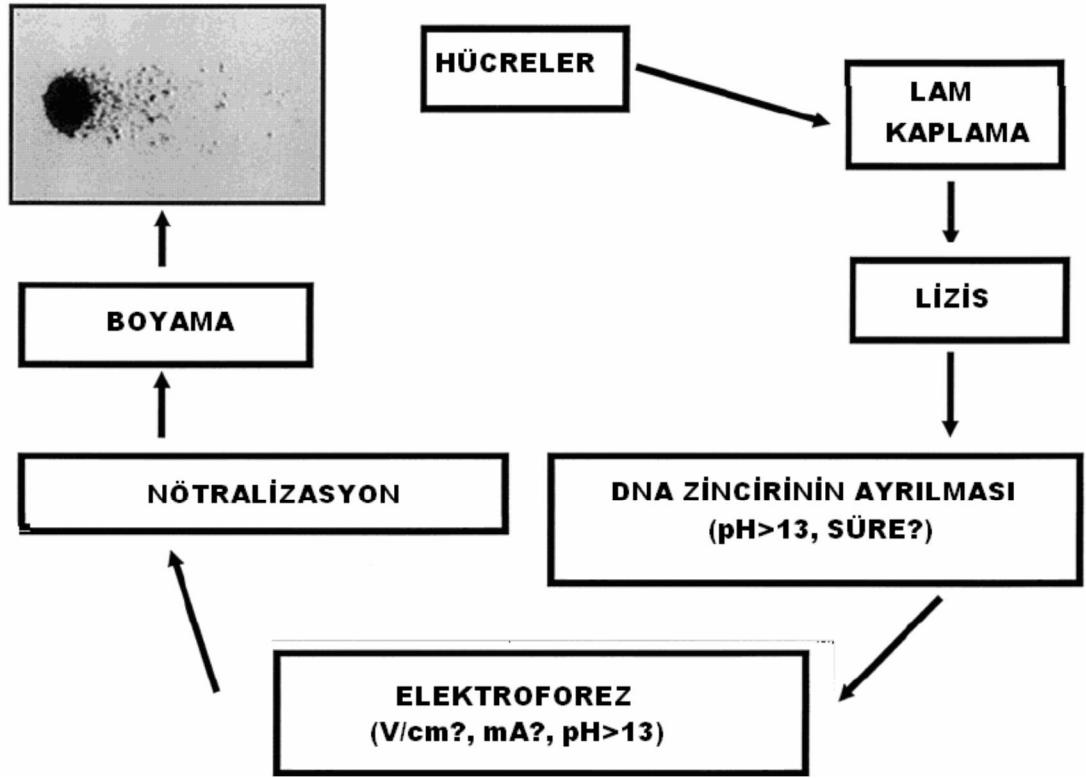
Comet yöntemi; düşük hasar düzeylerini bile saptayabilen duyarlı bir yöntem olması, az miktarda hücre örneği gerektirmesi, her tür ökaryotik hücreye uygulanabilmesi, hızlı, basit ve ucuz olması, kolay uygulanabilir olduğu için geniş popülasyonlara uygulanabilmesi gibi nedenlerle yaygın olarak kullanımı giderek artmaktadır.

5.6. Uygulama Protokolü

Comet yönteminin alkali protokolü ile düşük düzeylerdeki zincir kırılmalarını, yüksek duyarlılık ile tayin edilmesi amaçlanmıştır. Şekil 7' de alkali comet tekniğinin kritik basamakları gösterilmiştir. Singh ve arkadaşları tarafından geliştirilen alkali comet protokolü 7 basamak içermektedir [84, 86, 87, 131].

1. Mikroskopik lamaların hazırlanması
2. DNA' nın serbestleşmesi için hücrelerin lizizi
3. Zincir kırıkları gibi lezyonların açığa çıkması için alkali muamele ($\text{pH}>13$)
4. Alkali şartlarda elektroforez ($\text{pH}>13$)
5. Alkali şartların nötralizasyonu ($\text{pH}=7.5$)
6. DNA' nın boyanması ve comet görüntülenmesi
7. Comet skorlaması

Yöntemdeki uygulama farklılıklarının çoğu elektroforez sırasında görülür; uygulanan voltaj, elektroforez zamanı ve tampondaki tuz konsantrasyonu değiştirilebilecek parametrelerdir [109, 131]. Tekniğin uygulanmasında iki tip jel modeli vardır. Tek tabakalı jel ve sandviç jeller. Daha yaygın olarak kullanılan, sandviç modelidir. Singh ve arkadaşlarının [84] comet protokolünde; az sayıda hücre içeren düşük kaynama noktalı (LMP) agaroz jel, iki normal kaynama noktalı (NMP) agaroz jel tabakası arasına ince tabaka halinde mikroskopik lamalar üzerinde sandviç edilir. Gömülen bu hücreler, liziz solüsyonunda bekletilir. En çok tercih edilen yöntem, en az bir saat süreyle, $\text{pH}>10-12$ ' de, deterjanla ve yüksek tuz konsantrasyonunda hücrelerin bekletilmesi şeklindedir. Liziz sırasında protein ve lipidler uzaklaştırılmış, hücre membranında porlar açılmış olur. Ayrıca liziz ve alkali muamele basamakları arasında serbest DNA, proteinaz K ile muamele edilerek mevcut proteinler uzaklaştırılarak çeşitli enzim ve antikorlarla spesifik DNA hasarları araştırılabilir. Elektroforezden önce lamalar, alkali elektroforez solüsyonunda DNA sarmalının ayrılması için bekletilir. Bu sayede tek zincirli DNA oluşturularak SSB ve ALS' lerin ortaya çıkması sağlanır. Bu solüsyon $\text{pH}>12$ ve düşük tuz konsantrasyonunda olmalıdır. Uygulanacak olan elektroforez süresi ve voltajı hücrelerdeki DNA göçünü etkilediği için, bu parametreler denemelerle standardize edilmelidir. Elektroforezi takiben lamaların yıkanması için en çok tris tamponu tercih edilir. Böylelikle DNA' nın renatürasyonu sağlanmış olur. Son aşamada ise, DNA bağlayıcı boyalarla (akridin oranj, etidyum bromür, propidyum iyodür, DAPI, SYBR gren, YOYO gibi) floresan renk oluşturulur [87, 132].



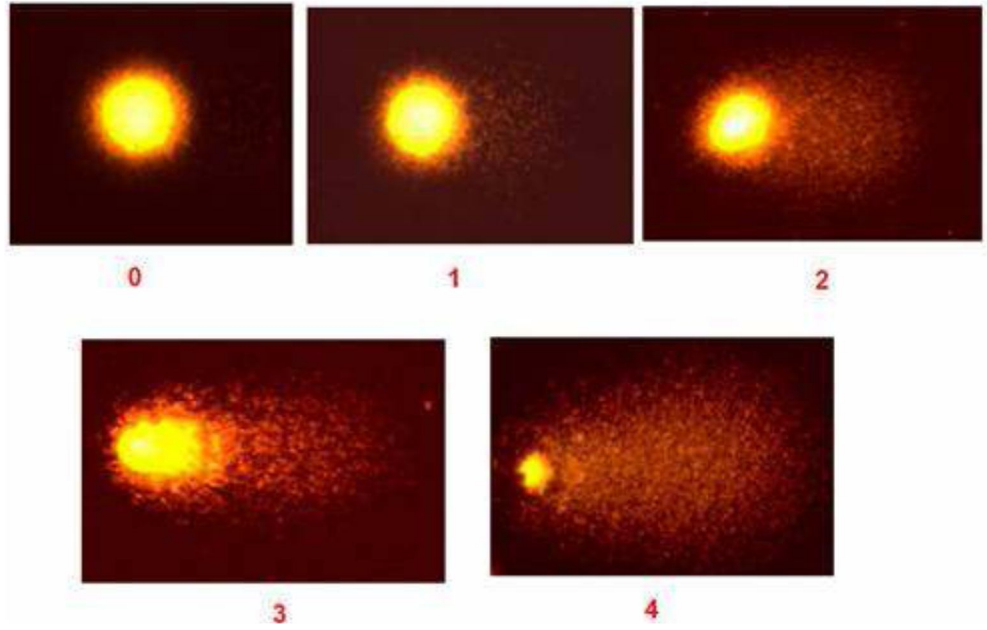
Şekil - 7. Alkali Comet tekniğinde kritik basamakların şematik gösterimi [87]

5.7. Comet Görüntülerinin Değerlendirilmesi

Comet görüntülerinin değerlendirilmesi iki şekilde olur:

1. Görsel analiz
2. Bilgisayar analizi

Gözlemler için 515-600 nm eksitasyon filtreli epi-floresan mikroskop kullanılır. Floresan boya ile boyanan hücreler floresan mikroskopta her alana birkaç hücre düşürülüp, 100 hücrenin sayımı yapıp değerlendirilir. Comet skorlamasında en basit yöntem görsel değerlendirmedir. Hasar büyüklüğü; hasarsızlıktan en çok hasara doğru 0-4 arasında olacak şekilde sınıflandırılır (Şekil-8). Görsel analiz, comet görüntülerinin değerlendirilmesinde yaygın kullanıma sahiptir. Özellikle basit olması, daha az zaman alması ve pahalı bilgisayar sistemlerine gereksinim göstermemesi sebebiyle sıklıkla tercih edilmektedir. Uzman gözlerin yaptığı görsel analiz sonuçları ile bilgisayarlı analiz sonuçları arasında önemli farklar olmadığı otoritelerce vurgulanmaktadır [105,111, 115, 130, 132, 142].



Şekil - 8. Görsel analiz ile Comet skorlaması [142]

Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki floresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir. Hasarlı hücrelerin baş uzunluğu, baş ve kuyruktaki DNA yüzdesi, kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti gibi çeşitli comet parametreleri ölçülebilmektedir. Bunlar arasında kuyruk momenti ve kuyruk uzunluğu en sık kullanılanlar olmasına rağmen, önerilen ve kullanımı gittikçe artan ölçüm parametresi kuyruk DNA yüzdesidir. Çünkü bu parametre cometlerin görünür kısmıdır ve kuyruk içindeki toplam DNA oranının çarpımı olarak tanımlanmaktadır [108, 131].

Gelişmiş laboratuvarlarda genellikle bilgisayar analizinden yararlanılmaktadır. Son yıllarda ise ölçümler LSM (Laser-scanning microscopy) teknolojisiyle geliştirilmiştir. Böylece sarmal kırılmalarındaki farklılıklar kolaylıkla belirlenebilmektedir. Belli bir bölgedeki DNA miktarı, o bölgedeki floresans yoğunluğu ile doğru orantılıdır. Bu özellikten yararlanarak dijital görüntü sistemlerinde ve analiz yazılım programlarındaki ilerlemeye paralel olarak daha hassas ve doğru sonuç veren miktar tayini yöntemleri geliştirilmiştir.

6. MATERYAL METOD

6.1. Yöntemde Kullanılan Aletler

- Dijital üstten kefeli terazi
- pH metre
- Soğutmalı santrifüj
- Elektroforez tankı
- Güç kaynağı
- Otomatik mikro pipetler
- Traşlı lam
- Lamel (32x64 boyutunda)
- 1.5 mL ependorf tüpü
- Plastik pastör pipeti
- Steril lateks eldiven
- Parafilm
- Cam şale
- Etüv
- Otoklav
- Isıtıcı
- Buzdolabı
- Termometre
- Benmari
- Mikrodalga Fırın
- Enjektör
- Fotoğraf makinalı Floresan ataçmanlı mikroskop.

6.2. Yöntemde Kullanılan Kimyasal Maddeler

- DMSO (Merck)
- NaCl (Merck)
- KCl (Merck)
- Histopaque 1077 (PAA)
- Etidyum Bromide Sigma)
- Triton-X 100 (Merck)
- EDTA (Sigma)
- Trizma Base (Merck)

- Low Melting Agarose (MP Biomedicals)
- Hight Melting Agarose (Sigma)
- Fosfat Tamponu PBS (PAA)
- KH_2PO_4 (Carlo Erba)
- Na_2HPO_4 (Merck)
- NaOH (Merck)
- Heparin (Sigma)
- Trypan Blue (Merck)

6.3. Yöntemde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

6.3.1.Fosfat Tamponu (10mM, pH 7.4, 1000mL)

Bir behere ayrı ayrı tartılarak;

- 136 mM (7.937 g) NaCl,
- 2.7 mM (0.201 g) KCL,
- 10 mM (1.4196 g) Na_2HPO_4
- 10 mM (1.3606 g) KH_2PO_4
- 600 mL distile su

Üzerlerine 600 mL distile su eklendikten sonra, karıştırılarak ve ısıtılarak çözünmeleri sağlandı. pH metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözelti pH' sı 7.4' e ayarlandı. Karışım kapaklı cam şişeye aktarılarak son hacim distile su ile 1L' ye tamamlandı. Kullanılncaya dek 2-8 °C' de buzdolabında saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı.

6.3.2.Lizis Çözeltisi (pH 10, 500mL)

Bir behere;

- 136 mM (7.937 g) NaCl
- 100 mM, (18.6 g) EDTA
- 10 mM, (0.6 g) Tris
- 350 mL distile su

Tartılarak konuldu. Üzerlerine 350 mL distile su eklenerek karıştırıcı yardımı ile çözünmeleri sağlandı. Çözelti pH' sı 10' a ayarlandıktan sonra karışım cam şişeye aktarılarak son hacim distile su ile 500 mL' ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti stok

  zeltimiz oldu ve 2-8  C' de buzdolabında saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı. Kullanılmadan yaklaşık bir saat önce

- 1ml %1' lik Triton-X100 den 1 ml
- %10' luk DMSO' dan 10 mL

alınıp mez rde son hacim 100 mL olacak şekilde stok liziz   zeltimiz ile tamamlandı. Soğuk liziz için buzdolabında bekletildi. DMSO kullanılması nın amacı, hayvansal dokuların kanlarındaki hemoglobinlerde bulunan serbest demir üretilen radikalleri temizlemektir.

6.3.3.Elektroforez Tamponu (pH 13.1, 1000 mL)

Elektroforez tamponunu hazırlamak için;

- Stok 1: 10 N (200 g) NaOH ile 500 mL distile su karıştırılır.
- Stok 2: 200 mM (14.89 g) EDTA ile 200 ml distile su karıştırılır.

Her iki stok oda sıcaklığında saklanmalı. Stok   zeltiler 2 haftada bir hazırlanmalıdır. Kullanım esnasında Stok 1' den 30 mL, Stok 2' den 5 mL bir mez re konur ve üzeri 1000 mL distile su ile tamamlanır ve karıştırılır. Tamponun pH 13' den büyük olması sağlanır. Toplam hacim elektroforez tankının hacmine göre ayarlanır.

6.3.4.Nötralizasyon Tamponu (pH 7.5, 250 mL)

Nötralizasyon tamponu hazırlamak için;

- 0.4 M, (15.76 g) Tris
- 250 mL distile su

Tartılarak bir behere aktarıldı.  zerine 150 mL distile su eklendi. Karıştırıcı yardımıyla eritilerek, pH' sı kalibre edilmiş pH metre ile 7.5' e ayarlandı. A zlı kapaklı cam    eye aktarılarak üzeri distile su ile 250 mL' ye tamamlandı. Kullanılınca kadar 2-8 C' de saklandı. Ayda bir yeni çözelti hazırlandı.

6.3.5.Düşük Kaynama Dereceli Agaroz (LMA)

Düşük kaynama dereceli agarozdan 0.75 g tartıldı; üzerine 10 mL PBS (10mM, pH 7.5) eklenerek 400 Watt mikrodalga fırında bir ta ım kaynatıldıktan sonra a zlı parafilm ile kapatıldı. Kullanılana kadar 2-8 C' de buzdolabında saklandı.

6.3.6.Normal Kaynama Dereceli Agaroz (NMA)

Normal kaynama dereceli agarozdan 1 g tartıldı; üzerine 100 mL PBS (10 mM, pH 7.5) eklendi. Mikrodalga fırında 400 Watt’ da bir taşım kaynatıldı. Kullanılana kadar beherin ağzı parafilm ile kapatılarak 2-8°C’ de buzdolabında saklandı.

6.3.7.Boyama Çözeltisi

Sıvı etidyum bromür için; şişedeki sıvı etidyum bromürden 20 µL alındı ve üzerine 9.980 µL distile su eklendi ve kimyasalın ışık almaması için cam şişenin yüzü alüminyum folyo ile sarılarak buzdolabında saklandı.

7. COMET TEKNİĞİ PROTOKOLÜ

Comet tekniği Singh ve ark. [84] tarafından geliştirilen metoda göre uygulandı.

7. 1. Lam Kaplama

Agaroz kaplı yüzeyleri kullanım sırasında karıştırılmaması için, lamaların kaplanacak olan yüzeyleri işaretlendi. Normal kaynama noktalı agaroz 70°C’ deki su banyosunda bekletildi. Hazırlanan lamalar tıraşlı olan bölgeleri yarısına kadar agarozla batırıldı ve alt yüzeyleri gazlı bezle silinerek düz bir zeminde oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Bir gün sonra lamalar toplanıp kutularda toz almayacak şekilde oda sıcaklığında ve aşırı nemli olmayan ortamlarda saklandı. Burada dikkat edilmesi gereken nokta lamalar üzerinde kabarcıkların kalmaması.

7. 2. Lenfosit İzolasyonu

Periferik beyaz kan hücrelerinin kolay elde edilebilmesi ve vücuttaki oksidatif stres düzeyini iyi yansıtabilmesi nedeniyle, genotoksisite çalışmalarında en çok lenfositler kullanılmaktadır [115]. Bu çalışmada sigara içmeyen 10 tane bayan ve 10 tane erkek bireylerden heparinli enjektör ile periferik kan alındı. Lenfosit izolasyonu numunelerin alınmasından sonra en geç bir saat içinde gerçekleştirildi.

Sağlıklı bireylerden alınan periferik kandan, içerisinde 1’ er mL (mililitre) fosfat tamponu (PBS) bulunan endorflara, 400’ er µl (mikrolitre) kan eklendi. Endorflardaki kan ve PBS’ nin karışması için yavaşça çalkalandı. Buz üzerinde bekletilen endorfların dip kısmına 300’ er µl histopaque eklendi. Histopaque’ ların üzerine PBS+Kan karışımımızdan 300 µl kan üst kısımda kalacak şekilde yavaşça konuldu. Endorflar 1060 rpm’ de 4°C’ de 6 dk santrifüj edildi. Lenfositler PBS ile

histopaque tabakası arasında kalan bölgede dikkatlice 100' er µl alınıp yeni ependorflara konuldu. Trypan blue ile hücrelerin yaşayabilirlik testi uygulandı ve ≥ 95 olduğu tespit edilmiştir. Aspartam, Asesulfam K, Sorbitol ve Sakkarinin (1.25, 2.5 ve 5 mg/ml) test maddelerinin dozları hazırlandı. Bu test maddelerin 100 µl alınarak ayırdığımız lenfositlerin üzerine konulup süspanse edilerek 37°C' de 1 saat inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonra 3000 rpm' de 5 dk santrifüj edilen tüplerin üst kısımlarındaki kimyasal çözeltimiz atıldı ve 100 µl PBS ile resüspanse edildi. 75 µl düşük erime ısı ısı agar (37°C) ile 100 µl lenfosit pipetaj yapılarak karıştırıldı. Bu karışım daha önceden HMA ile kaplanan lam üzerine 3 damla ilave edilerek lamelle kapatıldı. Tüm bu işlemler DNA' da ekstra hasar oluşumunu önlemek için loş ışıktaki gerçekleştirilmiştir. Agar katılaşp lama sabitleninceye kadar buz kalıplarının üzerinde 10-15 dk bekletildi. Süre sonunda lamaların üzerlerindeki lameller kenarlarından dikkatlice çekilerek cam şaleye konuldu. Soğuk lizing çözeltisi lamaların üzerini tamamen kaplayana kadar konulmuş ve ışık almaması için şalelerin yüzü alüminyum folyo ile sarılarak +4°C' de buzdolabında 1 saat lizizde bekletilmiştir.

7. 3. Yaşayabilirlik Değerlendirilmesi

Bir santrifüj tüpüne, periferel kandan ayırt ettiğimiz lenfositler den 20 µl alınır ve üzerine 10 µl Trypan Blue eklenir. En az iki dk bekledikten sonra lam üzerine konularak lamel ile kapatılır. Işık mikroskobu altında bakılır yaşayan hücreler parlak renksiz, ölü hücreler ise mavi renklidir. 100 tane hücre sayılır bunların içinde ölü hücrelerin sayısı düşölür, ve skor %90' nın üstünde olmalıdır.

7. 4. Elektroforez

Lizing çözeltisinde 1 saat bekleyen lamalar çözeltiden alınıp elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Lamaların üstünü kaplayacak şekilde elektroforez tamponundan yavaşça tanka dökölmüştür. Etrafi ışık almaması için kapatılmış ve 20 dk bu şekilde lamalar bekletilmiştir. Süre sonunda 25 V (volt), 300 mA' de (miliamper) 20 dk yürütölmüştür. Böylece sağlanan elektrik akımı sayesinde negatif yüklü DNA sarmal kırıklarının anoda doğru göç etmesi sağlanmıştır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta tankta boş alanın kalmaması ve güç kaynağının iyi ayarlanmasıdır. İstenilen voltajın ayarlanamaması halinde tanka elektroforez tamponu eklenir veya alınır.

7. 5. Lamların Boyanması

Elektroforez tankından çıkarılan lamlar cam şalelere dizilmiş ve oluşan kimyasal reaksiyonu stabilize etmek ve fazla tuz ve deterjanı uzaklaştırmak amacıyla lamlar nötralizasyon tamponuyla yıkanmıştır. Lamlar kuruması için oda sıcaklığında 10-15 dk bekletilmiştir. Bu işlem sonrasında her preparat üzerine floresan renk vermesi için etidyum bromid çözeltisi damlatılarak lamelle kapatılmış ve iyice boyanması için 10-15 dk bekletilmiştir. Burada etidyum bromid kanserojen olduğu için çalışma ortamı iyi havalandırılmalı ve eldivenle çalışılmasına özen gösterilmelidir. Ayrıca DNA' da fazladan hasar oluşmasını engellemek için loş veya karanlık ortamlarda yapılmalıdır.

7. 6. Sonuçların Değerlendirilmesi

Lamlar boyandıktan sonra her doz için hazırlanan 5 preparattan tüm jel taranarak üst üste gelen ve aşırı kuyruk oluşturmuş hücreler dikkate alınmadan rastgele 100 hücre seçilmiş ve x40 büyütme, 515-560 nm eksitasyon filtreli, 100 w civa lambalı Olympus marka floresan mikroskopta resimleri çekilmiştir. DNA' ları analiz etmek için, jel üzerindeki yürütülmeden elde edilen DNA parçaları baş ve kuyruk olarak iki ana bölüme ayrılmaktadır. Bilgisayar programı ile yapılan analizlerde birçok comet parametreleri kullanılmaktadır. Fakat çalışmamızda aşağıdaki parametreler kullanılmıştır:

1. Comet ortalaması (Comet mean)
2. Kuyruk alanı (Tail area)
3. Kuyruk yoğunluğu (Tail Intensity)
4. Kuyruk ortalaması (Tail mean)
5. Kafa ortalaması (Head mean)
6. Kuyruk uzunluğu (Tail length)
7. Kuyruktaki DNA (DNA Tail)
8. Kuyruk momenti (Tail Moment), % Tail DNA ile Tail Length' nin çarpımının 100 e bölünmesi ile elde edilen değerdir)
9. Olive kuyruk momenti (Olive Tail Moment) (Baş kısmının merkezi ile kuyruk kısmının merkezinin arasındaki mesafe farkının % Tail DNA ile çarpımının 100 e bölünmesi ile elde edilen bir değerdir)
10. Kafadaki DNA (DNA head)

Özellikle % Tail DNA, oluşan hasarın derecesi ile doğru orantılı olup stres kaynağının şiddeti hakkında bilgi vermektedir [143, 144].

Çalışmamızda çektiğimiz fotoğraflar Comet Görüntü İşleme ve Analiz Programı Sistemi (BAB BS 200 Pro) programı kullanılarak değerlendirme yapılmıştır. Comet parametreleri olarak Comet ortalaması, kuyruk alanı, kuyruk yoğunluğu, kuyruk ortalaması, kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA, kuyruk momenti ve Olive Tail Moment parametreler ile sonuçlar değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 15 ile değerlendirilmiştir.

8. BULGULAR

8.1 Comet Parametreleri

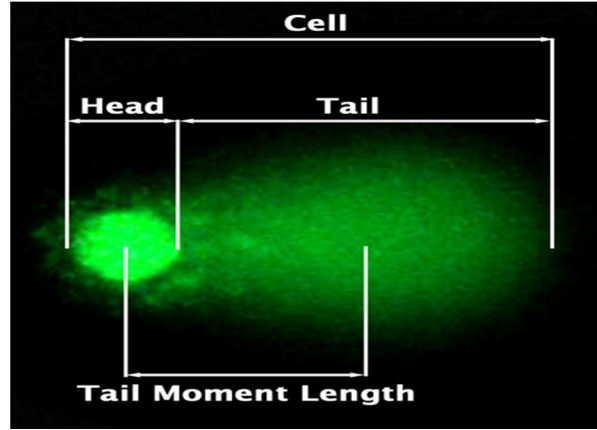
Comet assay yönteminin istatistiksel veri ve analizleri için 34 farklı parametre kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız parametreler ve açıklamaları aşağıda verilmiştir. Görsel analizde kullanılan temel kriter Şekil-9 da görülmektedir. Hasarlı hücrenin oluşturduğu kuyruk ve kafa kısımları ayrıntılı olarak verilmiştir.

1. Kuyruk Uzunluğu (tail length): Kuyruk uzunluğu çekirdeğin DNA göçü mesafesidir ve DNA tahribat derecesini değerlendirmek için kullanılmıştır.
2. Olive Kuyruk Momenti (Olive Tail Moment): Kuyruk momenti kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki toplam DNA fraksiyonun gösterimidir. Aşağıdaki formül ile hesaplanır.
$$\text{Olive Tail Moment} = (\text{Tail.mean} - \text{Head.mean}) \times \text{Tail\%DNA} / 100.$$
3. Kafadaki DNA (Head DNA): Hücrelerin kafa kısmında bulunan DNA miktarının göstergesidir. Aşağıdaki formülle hesaplanır:
$$\text{Head DNA} = (\text{Head Intensity} / (\text{Head Intensity} + \text{Tail Intensity})) \times 100.$$
4. Kuyruktaki DNA (Tail DNA): Kuyruktaki DNA miktarının göstergesidir. Aşağıdaki formülle hesaplanır;
$$\text{Tail \% DNA} = 100 - \text{Head\%DNA}$$
5. Comet Ortalaması (Comet mean): DNA ları hasar gören hücrelerin oluşturduğu comet (kuyruklu yıldız) ortalamalarını gösteren parametredir.
6. Kuyruk Alanı (Tail area): Cometin kuyruğunu oluşturan sınırlar içinde kalan alandır.
7. Kuyruk Yoğunluğu (Tail Intensity): Cometi belirleyen piksellerin renk yoğunluğudur. Aşağıdaki formülle belirlenir;

$$I_{total} = \frac{I_{sum}}{255}$$

8. Kuyruk Ortalaması (Tail mean): Kuyruğun piksel olarak oluşturduğu ortalama gösteren parametredir.
9. Kafanın Ortalaması (Head mean): Kafanın piksel olarak oluşturduğu ortalama değerini gösteren parametredir.
10. Kuyruk Ortalaması (Tail moment): Kuyruk momentinin değeridir. Aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\text{Tail moment} = \text{Tail Length} \times \text{Tail İntensity} / \text{Comet İntensity}$$



Şekil-9. Cometlerin oluşturduğu kuyruk ve kafanın hücre üzerinde gösterimi

8. 2. Asesulfam K' nın DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri

Asesulfam K ile 1 saat muamele edilen insan periferel lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tatlandırıcının farklı dozları ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarının meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 2a, Çizelge 2b). Asesulfam K'nın Comet parametreleri birbirleri ve kontrol ile karşılaştırılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sırasıyla, Comet ortalaması (Comet mean), kuyruk alanı (tail area), kuyruk yoğunluğu (tail intensity), kuyruk ortalaması (tail mean), kafa ortalaması (head mean), kuyruk uzunluğu (tail length), kuyruktaki DNA (DNA tail), kuyruk momenti (tail moment), Olive kuyruk momenti (Olive tail moment) ve kafadaki DNA (DNA head) için yapılmıştır.

Comet ortalaması, kuyruk alanı, kuyruk yoğunluğu, kuyruk ortalaması, kafa ortalaması, kuyruktaki DNA ve kafadaki DNA için yapılan istatistiksel analizlerde kontrol grubu ile madde uygulanmış gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu tespit edilmiştir. Özellikle 5 ppm lik uygulamada Comet parametrelerinden kuyruk uzunluğu ve kuyruk momenti parametreleri için yapılan incelemelerde kontrol grubu ile en düşük doz olan 1.25 ppm lik uygulama grubu arasında istatistiksel bir farkın olmadığı belirlenmiştir. Buna karşılık diğer gruplar arasındaki fark önemlidir. Aynı şekilde Olive kuyruk momenti için yapılan incelemede ise kontrol grubu ile 2.5 ppm ve 5 ppm arasında istatistiksel bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

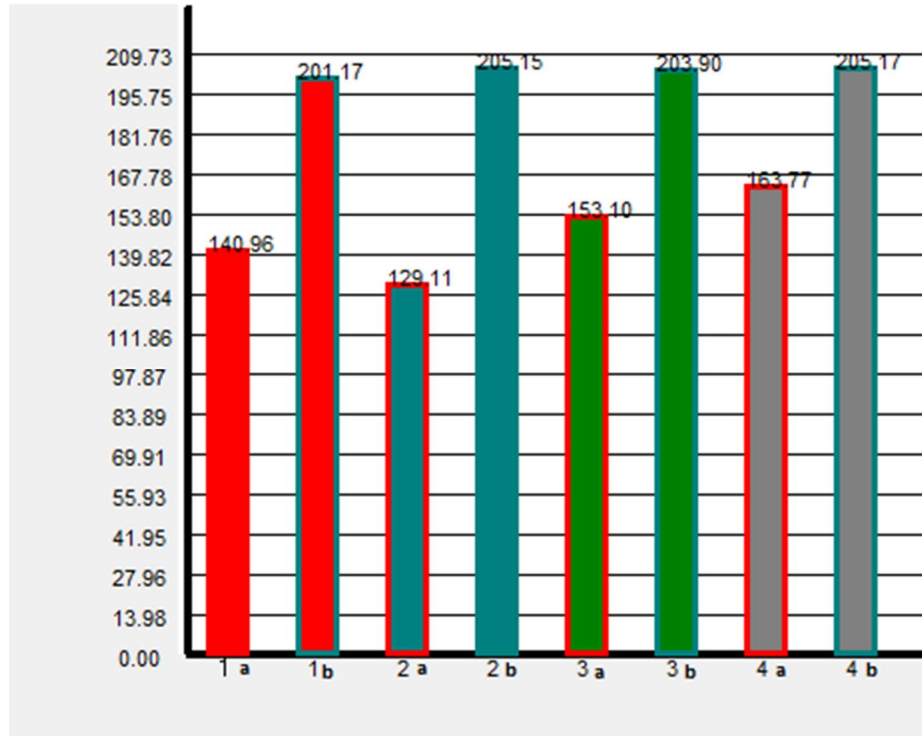
Çizelge 2.a Farklı dozlarda Asesulfam K ile 1 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde DNA hasarı

Asesulfam K	Comet Ortalaması	Kuyruk Alanı	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Ortalaması	Kafa Ortalaması
Kontrol	175.63±0.29a	41,29±2.17a	199477±1.17a	201,17±0.05a	140,95±2.23 a
1.25 ppm	169.05±0.13b	43,55±1.52b	312247±2.21b	205,15±0,95b	129,10± 2.18b
2.50 ppm	187.30±1.25c	189,09±0.99c	1224388±1.39c	203,90±1.28c	153,09±3.01 c
5.00 ppm	196.99±1.11d	527,22±1.25d	1096503±1.74d	205,17±2.45b	163,77±1.97 d

Çizelge 2.b Farklı dozlarda Asesulfam K ile 1 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde DNA hasarı

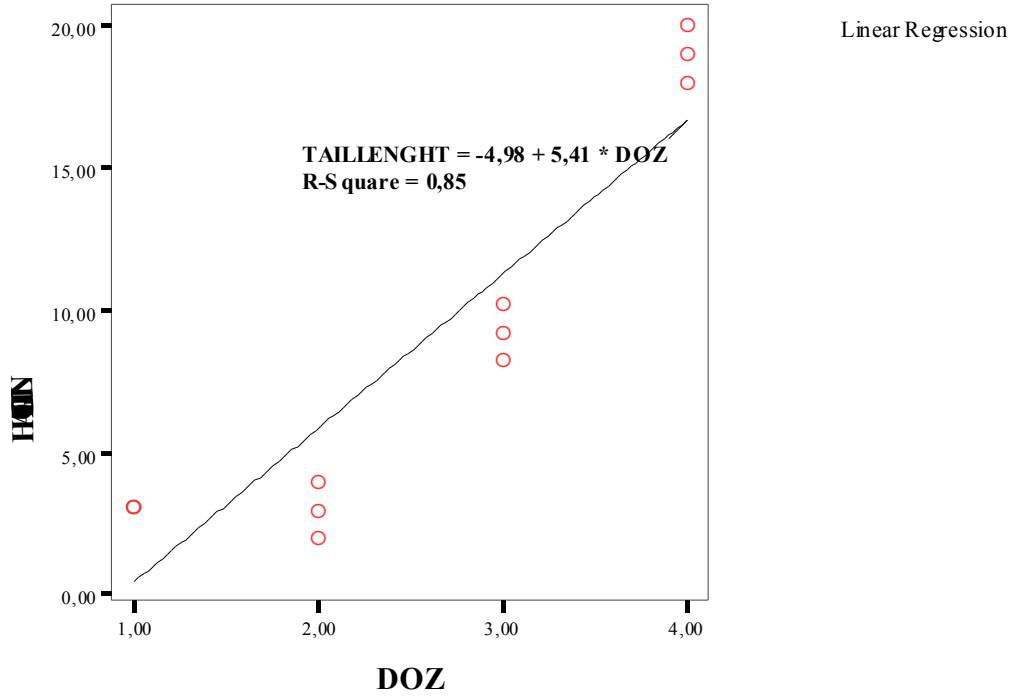
Asesulfam K	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki DNA	Kuyruk Momenti	OliveKuyruk Momenti	Kafadaki DNA
Kontrol	3,05±0.14a	69,22±1.64a	2,19±1.16a	41,02±1.34a	30,78±1.92 a
1.25 ppm	2,96±1.55a	65,72±2.45b	2,08±0.92a	49,95±1.58b	34,28 ±2.11b
2.50 ppm	9,21±1.02b	79,06±3.18c	7,87±1.36b	41,14±1.29a	20,94 ±2.09c
5.00 ppm	19,01±0.63c	89,75±2.47d	17,60±1.58c	40,92±1.21a	10,24 ±1.23d

Şekil-10 da Comet parametreleri arasında belirleyici özelliğe sahip olan kafa ortalaması ve kuyruk ortalaması için hazırlanmış grafik görülmektedir. Grafikte görüldüğü gibi kuyruk ortalaması değeri kontrole nazaran ciddi bir artış göstermektedir. Bu durum çalışmada kullanılan tatlandırıcının hücredeki DNA nın yapısını bozduğunu ve hasar oluşturduğunu göstermektedir.



1a.Kontrol: Head Mean (kafanın ortalaması)
 1b.Kontrol: Tail Mean (kuyruk ortalaması)
 2a.Asesulfam K 1.25 ppm: Head Mean
 2b.Asesulfam K 1.25 ppm: Tail Mean
 3a. Asesulfam K 2.5 ppm: Head Mean
 3b. Asesulfam K 2.5 ppm: Tail Mean
 4a.Asesulfam K 5.0 ppm: Head Mean
 4b.Asesulfam K 5.0 ppm: Tail Mean

Şekil - 10. Farklı dozlarda Asesulfam K ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması



1.00: Kontrol, 3.00: 2.5 ppm
2.00: 1.25 ppm 4.00: 5 ppm

Şekil-11. Asesulfam K' nın oluşturduğu DNA hasarının Kuyruk uzunluğunun (tail length) regresyon eğrisi

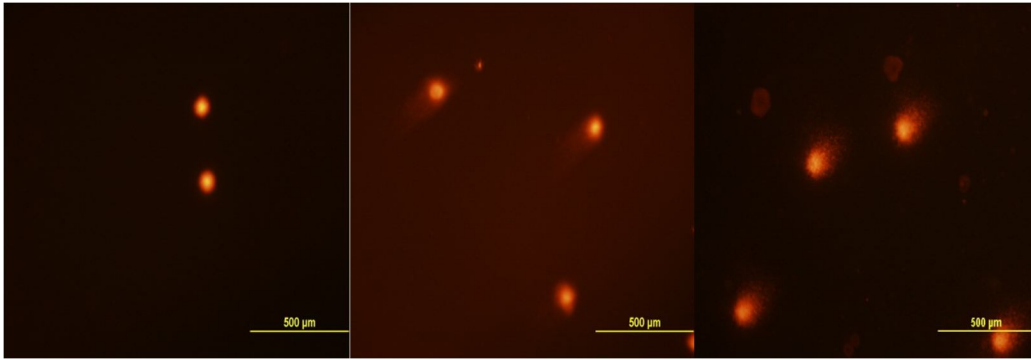
Şekil-11 deki regresyon eğrisi incelendiğinde uygulama dozları ile kuyruk uzunluğu arasında pozitif bir ilişkinin ($r=0,85$) olduğu görülmektedir. Buna göre uygulama dozları arttıkça DNA daki hasar oranı da artmaktadır. Bulunan bu ilişki katsayısı istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). Yine dozlar ile kuyruk uzunluğu arasında yapılan regresyon analizi sonucunda

$$\hat{Y}_{dna} = -4.98 + 5.41$$

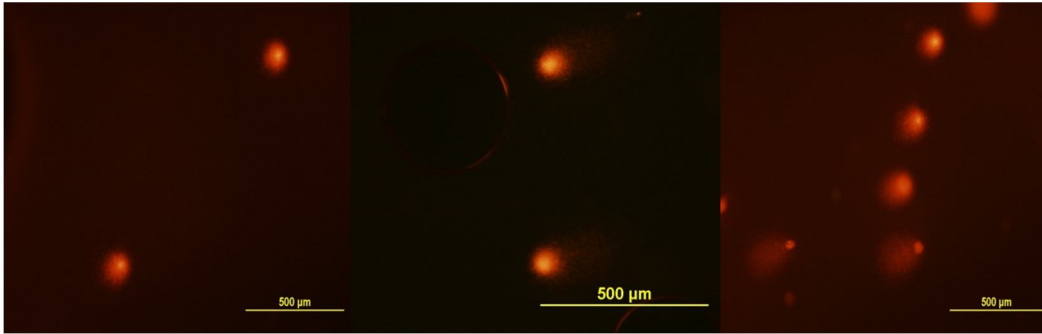
bağıntısı bulunmuştur. Buna göre dozlar bir birim arttığında kuyruk uzunluğunda 4.98 birim artmıştır.



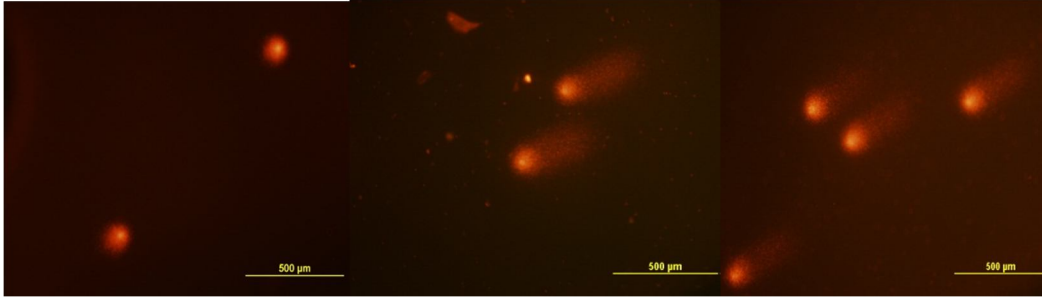
Şekil-12. Kontrol grubunda değerlendirmeye alınan hücreler (x40)



Şekil-13. Asesulfam K' nın 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-14. Asesulfam K' nın 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-15. Asesulfam K' nın 5.00 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferall lenfosit hücreleri (x40)

Comet assay yönteminde floresan mikroskobunda çektiğimiz 100 fotoğraftan örnekler Şekil-12, 13, 14 ve 15 de görölmektedir. Bu örnekler BAB BS 200 Pro analiz programı ile sonuçları değerlendirilen fotoğraflar arasından rastgele seçilmiştir. Comet assay yönteminin temel kriterini oluşturan floresan yoğunluğu ile DNA hasarı bu fotoğraflarda açıkca görölmektedir. Kontrol ile tatlandırıcı muamele edilen gruplar incelendiğinde hücrelerde kuyruk oluştuğu görölmüştür.

8. 3. Aspartam' ın DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri

Gıda tatlandırıcısı olarak günümüzde sıkça kullanılan tatlandırıcılardan biri olan Aspartam' ın (1.25, 2.5 ve 5 ppm) farklı dozları ile 1 saat insan periferall lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tatlandırıcının farklı dozları ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarının meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 3a, Çizelge 3b).

Aspartam' ın Comet parametreleri birbirleri ve kontrol ile karşılaştırılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sırasıyla, Comet ortalaması (Comet mean), kuyruk alanı (tail area), kuyruk yoğunluğu (tail intensity), kuyruk ortalaması (tail mean), kafa ortalaması (head mean), kuyruk uzunluğu (tail length),kuyruktaki DNA (DNA tail), kuyruk momenti (tail moment), Olive kuyruk momenti (Olive tail moment) ve kafadaki DNA (DNA head) için yapılmıştır.

Comet ortalaması, kuyruk alanı, kuyruk yoğunluğu, kuyruk ortalaması, kafa ortalaması, kuyruk uzunluğu, kuyruk momenti ve kafadaki DNA için sonuçlar değerlendirildiğinde kontrol grubu ile tatlandırıcı uygulanmış gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu tespit edilmiştir. Comet parametrelerinden en önemlisi kuyruktaki DNA dır. Çünkü bu parametre cometlerin görünür kısmıdır ve direk hasarlı DNA' ların floresan yoğunluğuna göre sonuç verir.

Aynı maddenin kuyruktaki DNA parametresi incelendiğinde kontrol ile 1.25 ppm ve 2.5 ppm lik gruplar arasında istatistiksel farkın olduğu tespit edilmiştir. Fakat 2.5 ppm ile 5 ppm arasında kuyruktaki DNA ya bakıldığında istatistiksel farkın olmadığı bulunmuştur. Olive kuyruk momenti için yapılan incelemede kontrol grubu ile 1.25 ve 2.5 ppm' lik gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Çizelge 3b' de kafadaki DNA parametresi değerlendirildiğinde kontrol ile uygulama grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu tespit edilmiştir. Fakat dozlar arasında karşılaştırma yapıldığında 2.5 ppm ile 5 ppm arasında fark anlamlı bulunmamıştır.

Çizelge 3.a Farklı dozlardaki Aspartam ile 1 saat muamele edilmiş insan periferallenfositlerinde DNA hasarı

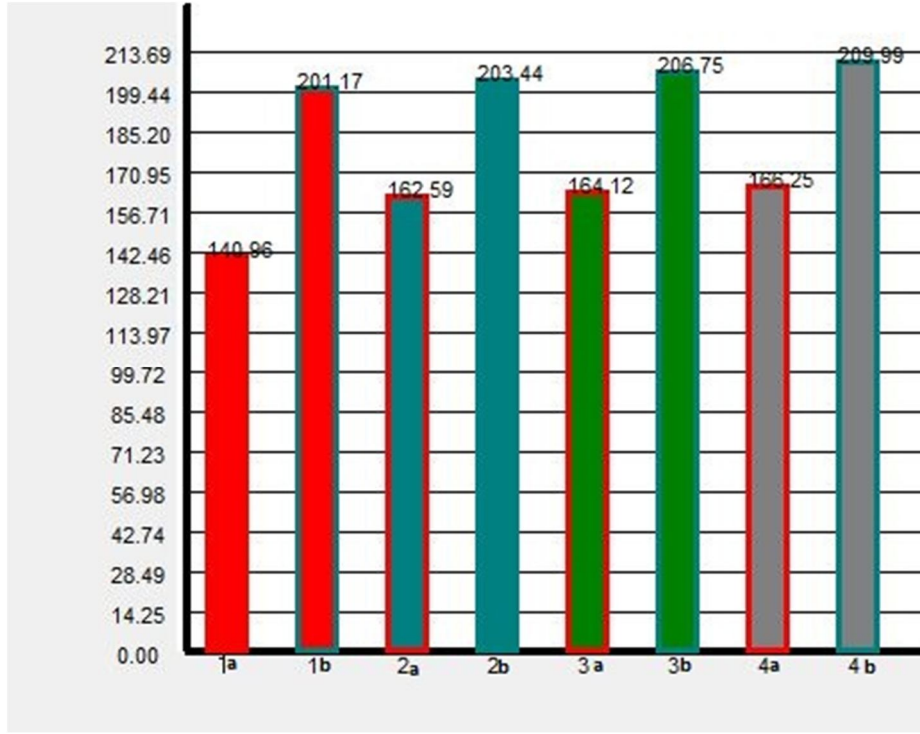
Aspartam	Comet Ortalaması	Kuyruk Alanı	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Ortalaması	Kafa Ortalaması
Kontrol	175.63±0.29a	41,29±2.17a	199477±1.17a	201,17±0.05a	140,95±2.23 a
1.25 ppm	193.38±2.19b	355.09±3.12b	836695.2±2.65b	203.44±2.51b	162,59 ±1.29b
2.50 ppm	198.43±1.46c	515.38±2.78c	1095542±1.43c	206.75±3.48c	164,12 ±1.18c
5.00 ppm	202.95±2.98d	213.32±1.29d	626036.6±2.75d	209.99±1.52d	166, 25 ±0.79d

Çizelge 3.b Farklı dozlardaki Aspartam ile 1 saat muamele edilmiş insan periferallenfositlerinde DNA hasarı

Aspartam	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki DNA	Kuyruk Momenti	Olive kuyruk Momenti	Kafadaki DNA
Kontrol	3,05±0.14a	69,22±1.64a	2,19±1.16a	41,02±1.34a	30,78±1.92 a
1.25 ppm	13.88±1,58b	87.15±1.93b	12.55±1.76b	41.31±2.21a	12,84 ±1.77b
2.50 ppm	18.92±1.87c	89.45±2.00c	17.62±1.00c	41.05±2.17ac	10,55 ±2.01c
5.00 ppm	10.94±1.23d	90.15±1.87c	9.99±1.15d	39.62±1.21bc	9,85 ±1.54c

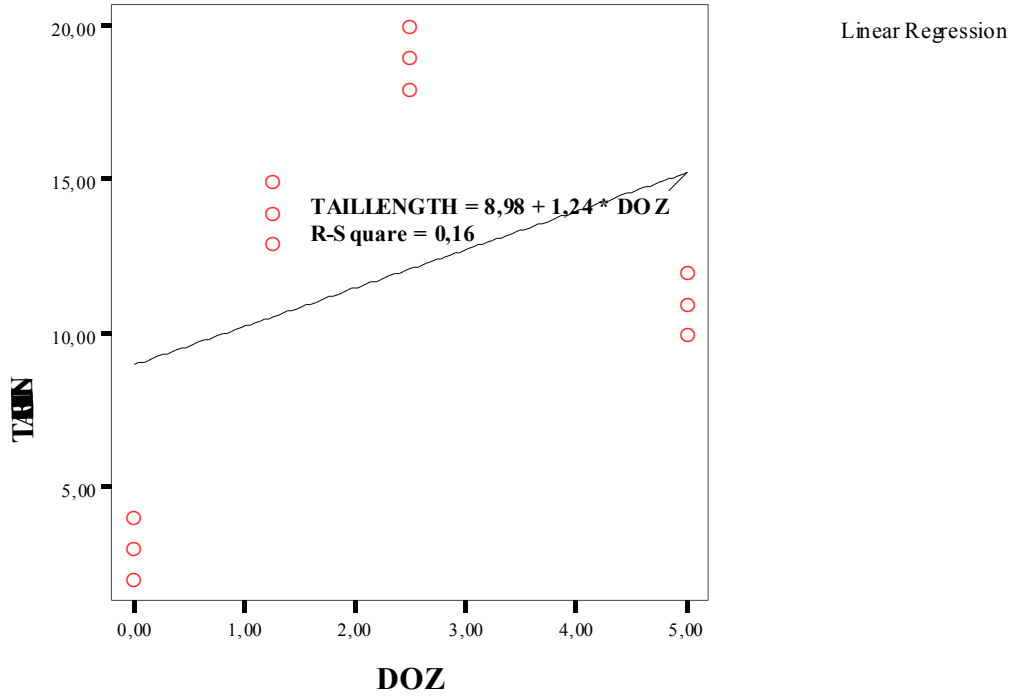
Şekil-16 da kullandığımız Comet parametreleri arasında belirleyici özelliğe sahip olan kafa ortalaması ve kuyruk ortalaması için hazırlanmış grafik görülmektedir. Gruplar ile kontrol incelendiğinde, kafa ortalamasında kontrole nazaran ciddi bir artış olduğu görülmektedir. Bu durum aspartam uygulanan lenfosit hücrelerinde normalde (hasarsız hücrede) daha yoğun ve stabil halde olması gereken kafa kısmının, uygulanan dozlara paralel olarak stabilitesi bozulmakta ve daha dağınık bir görüntü oluşturarak kafanın ortalamasını etkileyip DNA hasarını artırmıştır. Kuyruk ortalaması incelendiğinde kontrol ile tatlandırıcı uygulanan gruplar arasında istatistiksel farkın

olduğu görülmektedir. Çalışmamızda Aspartam' ın hücredeki DNA' nın yapısını bozduğu ve hasar oluşturduğu tespit edilmiştir.



- 1a.Kontrol: Head Mean (kafa ortalaması)
1b.Kontrol: Tail Mean (kuyruk ortalaması)
2a.Aspartam 1.25 ppm: Head Mean
2b.Aspartam 1.25 ppm: Tail Mean
3a. Aspartam 2.5 ppm: Head Mean
3b. Aspartam 2.5 ppm: Tail Mean
4a.Aspartam 5.0 ppm: Head Mean
4b.Aspartam 5.0 ppm: Tail Mean

Şekil – 16. Farklı dozlardaki Aspartam ile 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerinde oluşan DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması



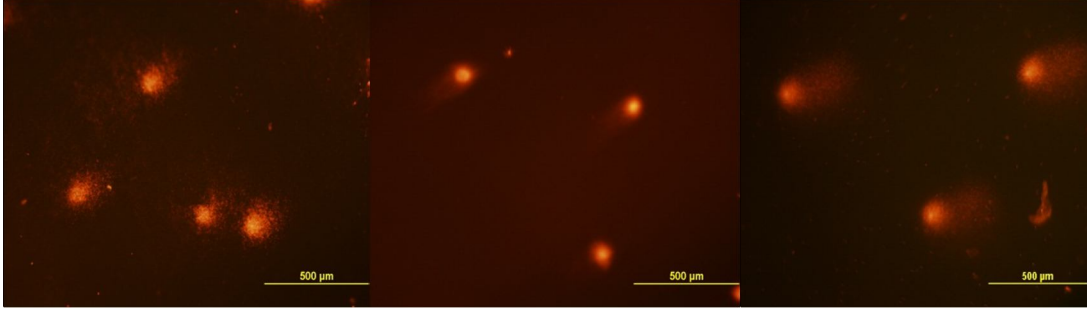
1.00: Kontrol, 3.00: 2.5 ppm
2.00: 1.25 ppm 4.00: 5 ppm

Şekil - 17. Aspartam'ın oluşturduğu DNA hasarının kuyruk uzunluğunun (tail length) regresyon eğrisi

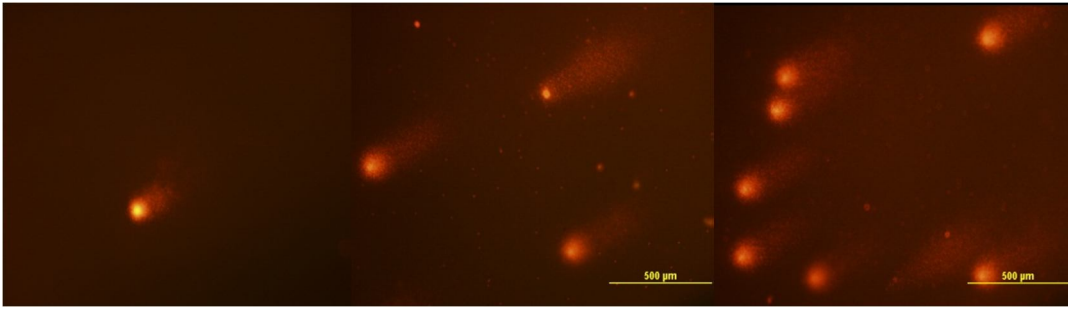
Şekil-17 de Aspartam'ın regresyon eğrisi incelendiğinde dozlar ile kuyruk uzunluğu arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunmuştur ($r=0,16$). Bu sonuca göre uygulama dozları arttıkça DNA'daki hasar oranı da artmaktadır. Bulunan bu ilişki katsayısı istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Yine dozlar ile kuyruk uzunluğu arasında yapılan regresyon analizi sonucunda,

$$\hat{Y}_{dna} = 8,98 + 1,24$$

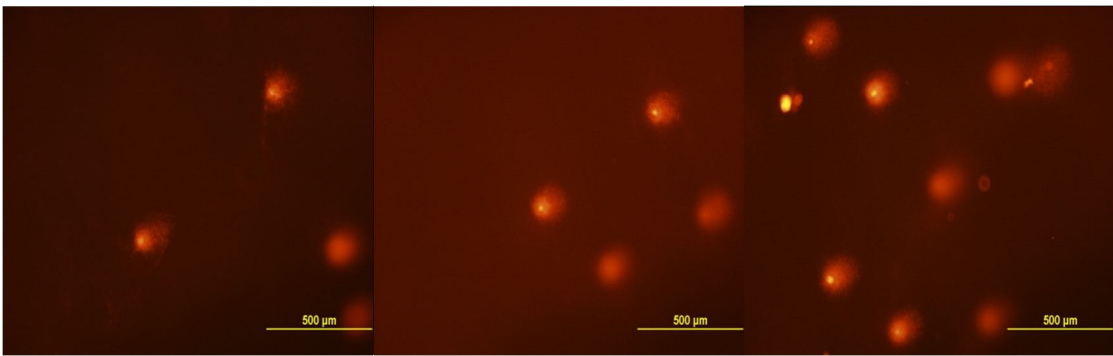
bağıntısı bulunmuştur. Bu sonuca göre dozlar bir birim arttığında kuyruk uzunluğunda 8.98 birim artmıştır.



Şekil-18. Aspartam' ın 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-19. Aspartam' ın 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)



Şeki-20. Aspartam' ın 5.00 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)

Comet yönteminde floresan mikroskobunda her doz için çektiğimiz 100 fotoğraftan örnekler Şekil 18, 19 ve 20' de görülmektedir. Bu örnekler BAB BS 200 Pro analiz programı ile sonuçları değerlendirilen fotoğraflar arasından rastgele seçilmiştir.

Şekil-12 deki kontrol grubu ile Şekil-18, 19 ve 20 deki katkı maddesi uygulanan grupların kuyruk uzunlukları incelendiğinde hasar oluştuğu ve hücrelerde oluşan DNA kırıklarının elektroforez aşamasında göç ettikleri görülmüştür.

8. 4. Sakkarin' in DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri

Sakkarin ile 1 saat muamele edilen insan periferik lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tatlandırıcının farklı dozları ile (1.25, 2.5 ve 5 ppm) 1 saat *in vitro* ortamda muamele edilen hücrelerde DNA hasarının meydana geldiği tespit edilmiştir (Çizelge 4a, Çizelge 4b). Sakkarin uygulanan grup ile kontrol karşılaştırılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme için kullanılan Comet parametreleri sırasıyla, Comet ortalaması (Comet mean), kuyruk alanı (tail area), kuyruk yoğunluğu (tail intensity), kuyruk ortalaması (tail mean), kafa ortalaması (head mean), kuyruk uzunluğu (tail length), kuyruktaki DNA (DNA tail), kuyruk momenti (tail moment), Olive kuyruk momenti (Olive tail moment) ve kafadaki DNA (DNA head) için yapılmıştır.

Comet ortalaması, kuyruk alanı, kuyruk yoğunluğu, kuyruk ortalaması, kafa ortalaması, kuyruk uzunluğu, kuyruktaki DNA, kuyruk momenti ve kafadaki DNA için yapılan analizlerde kontrol grubu ile madde uygulanmış gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farkların bulunduğu tespit edilmiştir. Fakat hücrelere uygulanan doz arttıkça hasar artışı doğru orantılı olarak artmamıştır. 2.5 ve 5 ppm lik gruplar karşılaştırıldığında 5 ppm lik dozda hasar oranı azalmıştır. Maksimum doz incelendiğinde, kuyruk uzunluğunun 2.5 ppm' den daha az olduğu görülmüştür. Bu değer diğer dozlarda oluşan kuyruk uzunluğundan küçük olmasının nedeni ya DNA hasar oranı azdır ya da hasarlı DNA' nın boyutu büyük olduğundan kırıklar jeldeki porlardan geçip yürüyememiş ve kafa kısmına yakın bölgede kalmış olabileceği düşünülmüştür. Olive kuyruk momenti için yapılan incelemede ise kontrol ile 1.25 ppm lik uygulama grubu arasında istatistiksel bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.b).

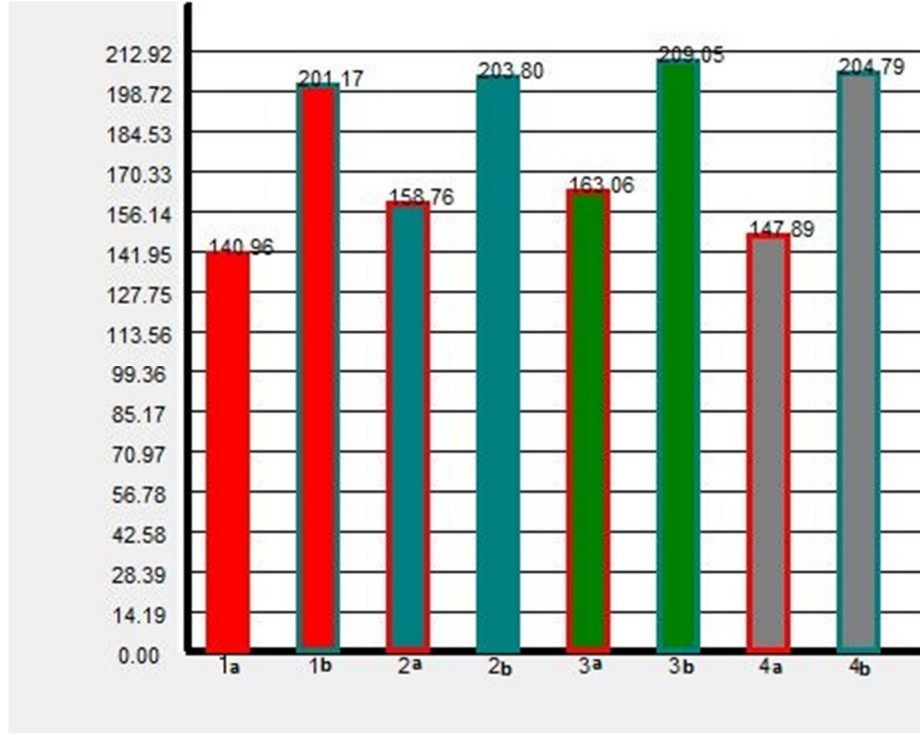
Çizelge 4.a Değişik dozlardaki Sakkarin ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarı

Sakkarin	Comet Ortalaması	Kuyruk Alanı	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Ortalaması	Kafa Ortalaması
Kontrol	175.63±0.29a	41,29±2.17a	199477±1.17a	201,17±0.05a	140,95±2.23 a
1.25 ppm	194,25±2.18b	516,35±3.02b	1017929±1.51b	203,80±2.41b	158,75± 3.45b
2.50 ppm	202,77±1.39c	586,24±1.27c	1298024±0.98c	209,05±1.22c	163,06 ±2.54c
5.00 ppm	187,12±1.87d	339,83±2.13d	876116±3.05d	204,79±2.32d	147,88 ±1.23d

Çizelge 4. b Değişik dozlardaki Sakkarin ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarı

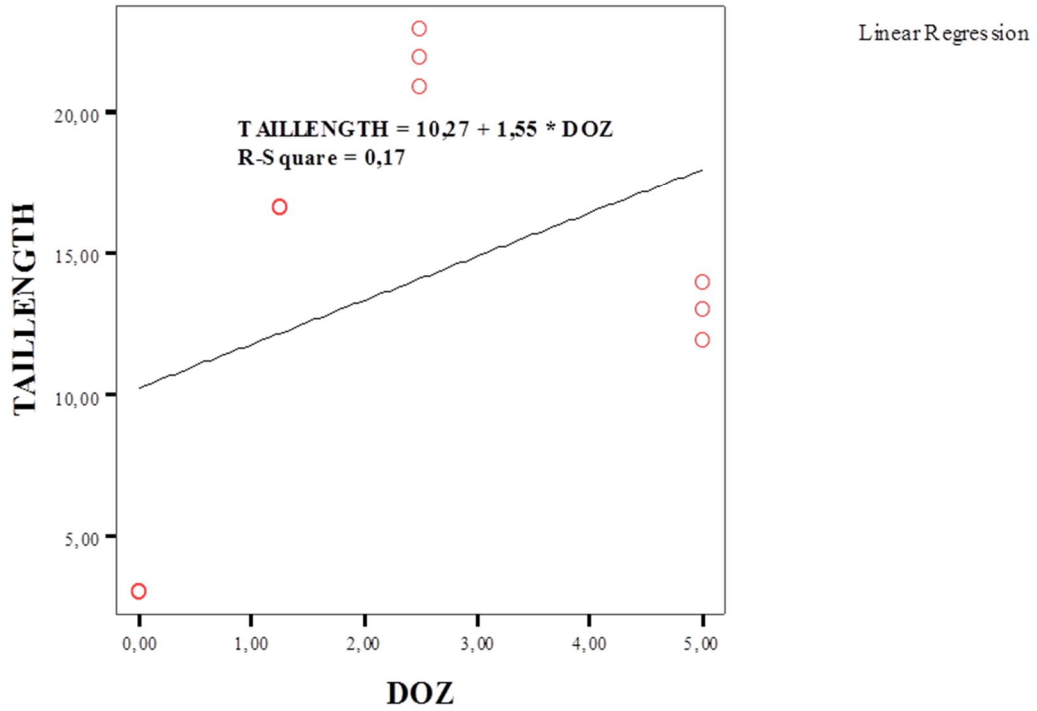
Sakkarin	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki DNA	Kuyruk Momenti	Olive kuyruk Momenti	Kafadaki DNA
Kontrol	3,05±0.14a	69,22±1.64a	2,19±1.16a	41,02±1.34a	30,78±1.92 a
1.25 ppm	16,63±1.52b	87,83±1.19b	15,49±1.85b	40,34±2.51a	12,17 ±3.53b
2.50 ppm	21,96±3.03c	92,00±2.14c	20,48±1,74c	42,53±2.04b	8,00 ±2.00c
5.00 ppm	13.00±2.27d	81,00±1.23d	11,61±2.46d	45,11±1.86c	19,31± 1.29d

Şekil-21 de Comet parametreleri arasında belirleyici özelliğe sahip olan kafa ortalaması ve kuyruk ortalaması için hazırlanmış grafik görülmektedir. Kafa ortalaması incelendiğinde kontrol ile Sakkarinin farklı dozları uygulanan gruplar arasında ki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur. Fakat dozlardaki hasar artış oranı düzenli değildir. 5 ppm lik grupta kafa ortalaması değeri 1.25 ve 2.5 ppm den daha az bulunmuştur. Kuyruk ortalaması değerine bakıldığında yine benzer sonuçların olduğu görülmektedir.



- 1a.Kontrol: Head Mean (Kafanın ortalaması)
1b.Kontrol: Tail Mean (Kuyruk ortalaması)
2a.Sakkarin 1.25 ppm: Head Mean
2b.Sakkarin 1.25 ppm: Tail Mean
3a.Sakkarin 2.5 ppm: Head Mean
3b.Sakkarin 2.5 ppm: Tail Mean
4a.Sakkarin 5.0 ppm: Head Mean
4b.Sakkarin 5.0 ppm: Tail Mean

Şekil - 21. Farklı dozlardaki Sakkarin ile 1 saat muamele edilmiş insan periferik lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması



1.00: Kontrol, 3.00: 2.5 ppm
2.00: 1.25 ppm 4.00: 5 ppm

Şekil - 22. Sakkarin'in oluşturduğu DNA hasarının kuyruk uzunluğunun (tail length) regresyon eğrisi

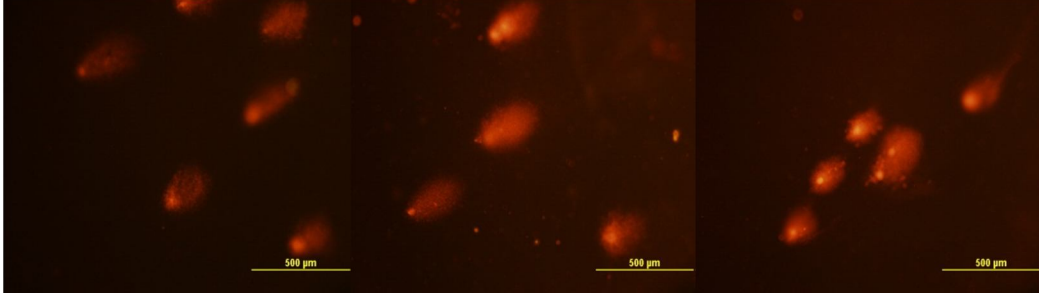
Şekil-22 de Sakkarin' in farklı dozlarının kuyruk uzunluğu parametresi için SPSS programında hazırlanan regresyon eğrisi görülmektedir. Eğri incelendiğinde uygulama dozları ile kontrol arasında pozitif bir ilişkinin ($r=0,17$) olduğu görülmektedir. Buna göre uygulama arttıkça DNA' daki hasar oranı da artmaktadır. Bulunan bu ilişki katsayısı istatistiksel olarak önemlidir ($p<0,05$). Kuyruk uzunluğu için yapılan regresyon analizi sonucunda

$$\hat{Y}_{dna} = 10.27 + 1.55$$

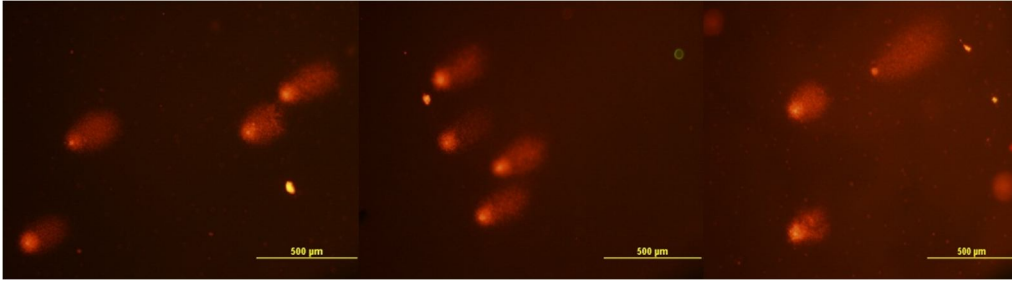
bağıntısı bulunmuştur. Buna göre dozlar bir birim arttığında kuyruk uzunluğu da 10,27 birim artmıştır.

Analiz aşaması için her preparattan rastgele çekilen 100 fotoğraftan birkaç örnek Şekil-23, 24 ve 25' de görülmektedir. Kuyruktaki floresan yoğunluğu hasarın derecesi ile paralellik göstermektedir. Kontrol grubundaki fotoğraf (Şekil-12) ile Sakkarin' in farklı dozlarının uygulandığı grupların fotoğrafları karşılaştırıldığında hücrelerde comet oluştuğu ve kuyruktaki floresan yoğunluğunun dozlara bağlı olarak arttığı bulunmuştur.

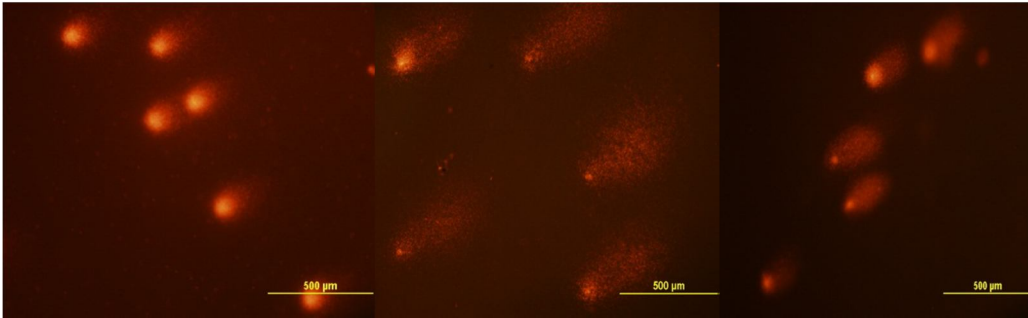
Bu durum çalışmada kullanılan tatlandırıcının hücredeki DNA' nın yapısını bozduğunu ve hasar oluşturduğunu göstermektedir.



Şekil-23. Sakkarin' in 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-24. Sakkarin' in 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-25. Sakkarin' in 5.0 ppm' lik dozu ile muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri (x40)

8. 5. Sorbitol' ün DNA Hasarı Üzerindeki Etkileri

Sorbitol ile 1 saat muamele edilen insan periferel lenfosit hücrelerindeki DNA hasarı Comet yöntemi ile değerlendirilmiştir. Tatlandırıcının farklı dozları (1.25, 2.5 ve 5 ppm) ile muamele edilen hücrelerde DNA hasarını meydana getirdiği tespit edilmiştir (Çizelge 5a, Çizelge 5b). Sorbitol' ün comet parametreleri birbirleri ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler sırasıyla, Comet ortalaması (Comet mean), kuyruk alanı (tail area), kuyruk yoğunluğu (tail intensity), kuyruk ortalaması (tail mean), kafa ortalaması (head mean), kuyruk uzunluğu (tail length), kuyruktaki DNA (DNA tail), kuyruk momenti (tail moment), Olive kuyruk momenti (Olive tail moment) ve kafadaki DNA (DNA head) için yapılmıştır.

Comet ortalaması, kuyruk alanı, kuyruk yoğunluğu, kuyruk ortalaması, kuyruk uzunluğu ve kafa ortalaması için yapılan analizlerde kontrol grubu ile madde uygulanmış gruplar arasında istatistiksel olarak önemli farkların olduğu bulunmuştur. Aynı maddenin kuyruk momenti ve kafadaki DNA parametreleri incelendiğinde kontrol grubu ile 1.25 ppm' lik doz arasında istatistiksel olarak farkın önemli olmadığı tespit edilmiştir. Yine aynı tatlandırıcının kuyruktaki DNA parametresi incelendiğinde 1.25 ppm ve 2.5 ppm ile 5.0 ppm' lik dozlar arasında kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı bulunmuştur. Olive kuyruk momenti incelendiğinde 1.25 ve 2.5 ppm' lik dozlar ile kontrolün istatistiksel sonuçları benzer çıkmış ve önemsiz bulunmuştur. Bu durum çalışmamızda kullandığımız Sorbitol' ün hücredeki DNA' nın yapısını bozduğunu fakat hasar oranının daha az seviyede gerçekleştiği sonucunu ortaya çıkarmıştır.

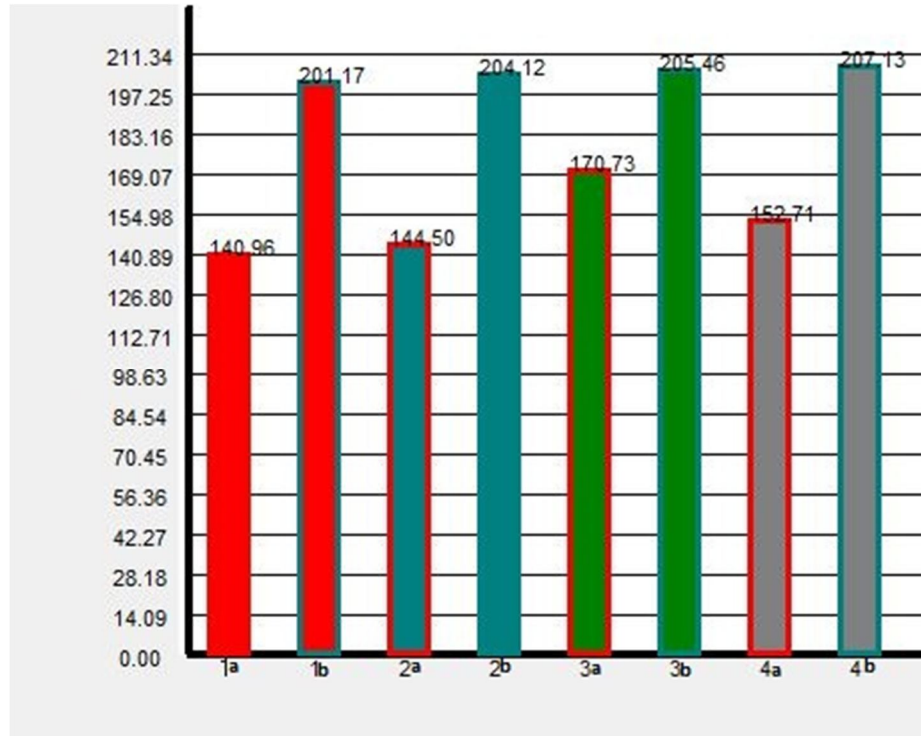
Çizelge 5. a Değişik dozdaki Sorbitol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerinde DNA hasarı

Sorbitol	Comet Ortalaması	Kuyruk Alanı	Kuyruk Yoğunluğu	Kuyruk Ortalaması	Kafa Ortalaması
Kontrol	175.63±0.29a	41,29±2.17a	199477±1.17a	201,17±0.05a	140,95±2.23 a
1.25 ppm	203.69±1.21b	77.93±3.14b	304031±2.25b	204.12±1.59b	144,49±2.44b
2.50 ppm	684.21±2.18c	866.83±2.53c	1509940±1.78c	205.47±2.02c	170,73±1.48c
5.00 ppm	194.52±1.59d	366.48±3.30d	1027179±3.21d	207.13±3.29d	152,70±1.59d

Çizelge 5. b Değişik dozdaki Sorbitol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferall lenfositlerinde DNA hasarı

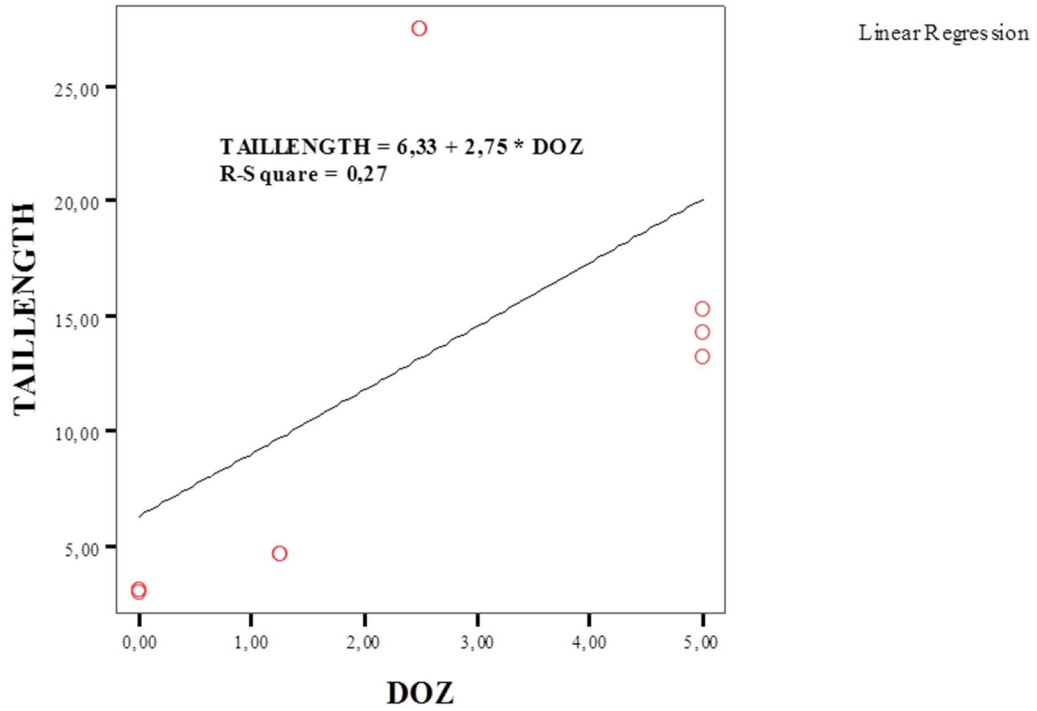
Sorbitol	Kuyruk Uzunluğu	Kuyruktaki DNA	Kuyruk Momenti	Olive Kuyruk Momenti	Kafadaki DNA
Kontrol	3,05±0.14a	69,22±1.64a	2,19±1.16a	41,02±1.34a	30,78±1.92 a
1.25 ppm	4,63±1.54b	70.00±1.38a	3.39±1.11a	41.44±2.15a	29,99±1.58a
2.50 ppm	27.44±2.17c	92.72±2.26b	25.85±1.64b	40.85±2.45a	7,28±2.47b
5.00 ppm	14.22±1.06d	85.17±1.35b	12.35±1.35c	46.78±3.51b	14,82±2.65c

Şekil-26 de Sorbitol' ün Comet parametreleri arasında DNA hasarını belirleyici özelliğe sahip olan kafa ortalaması ve kuyruk ortalaması için hazırlanmış grafik görölmektedir. Grafik incelendiğinde kafa ortalamasında kontrol ile 1.25 ppm' lik doz arasındaki sonucun yakın olduğu ve istatistiksel olarak önemsiz olduğu bulunmuştur. Kafa ortalamasında diğer dozlara göre en fazla hasarın 2.5 ppm' lik grupta olduğu tespit edilmiştir. Kuyruk ortalaması incelendiğinde 1.25 ppm, 2.5 ppm ve 5 ppm' lik gruplar ile kontrol için verilerin yakın olduğu fakat DNA hasarına bağılı olarak azda olsa kırıkların meydana geldiği tespit edilmiştir.



1a.Kontrol: Head Mean (kafa ortalaması)
1b.Kontrol: Tail Mean (kuyruk ortalaması)
2a.Sorbitol 1.25 ppm: Head Mean
2b.Sorbitol 1.25 ppm: Tail Mean
3a.Sorbitol 2.5 ppm: Head Mean
3b.Sorbitol 2.5 ppm: Tail Mean
4a.Sorbitol 5.0 ppm: Head Mean
4b.Sorbitol 5.0 ppm: Tail Mean

Şekil - 26. Farklı dozlardaki Sorbitol ile 1 saat muamele edilmiş insan periferel lenfositlerindeki DNA hasarının kuyruk ve kafadaki ortalamasının kontrol ile karşılaştırılması



Şekil - 27. Sorbitol ün oluşturduğu DNA hasarının kuyruk uzunluğunun (tail length) regresyon eğrisi

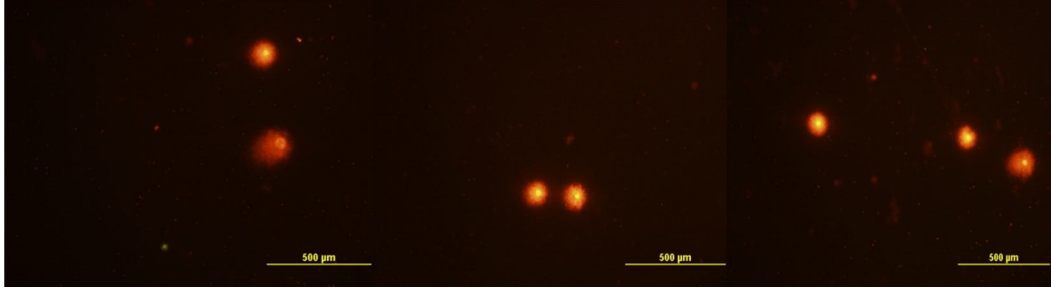
Şekil-27 de regresyon eğrisi incelendiğinde uygulama dozları ile kuyruk uzunluğu arasında pozitif bir ilişkinin ($r=0,27$) olduğu görülmektedir. Buna göre uygulama dozları arttıkça DNA’ daki hasar oranı da artmaktadır. Bulunan bu ilişki katsayısı istatistiksel olarak önemlidir ($p<0.05$). Dozlar ile kuyruk uzunluğu arasında yapılan regresyon analizi sonucunda,

$$\check{Y}_{dna}=6.33+2.75$$

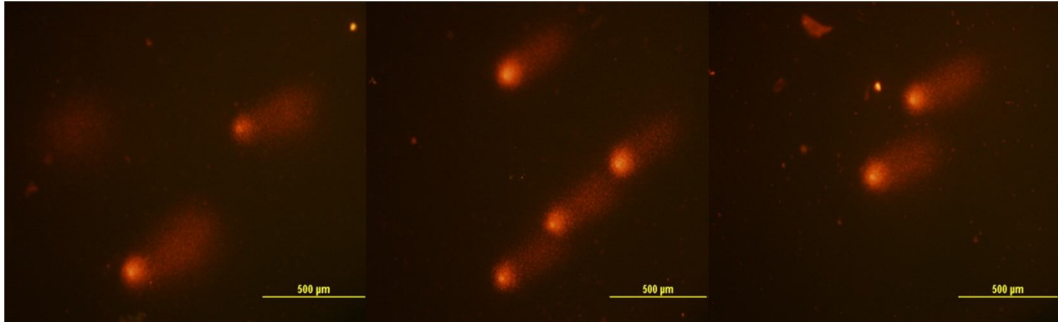
bağıntısı bulunmuştur. Buna göre doz miktarı bir birim arttığında DNA miktarında 6.33 birimlik bir artış görülmektedir.

Floresan mikroskopunda her grup için çektiğimiz 100 farklı fotoğraftan örnekler Şekil-28, 29 ve 30’ da görülmektedir. Fotoğraflar incelendiğinde 1.25 ppm’ lik dozda floresan yoğunluğunun ve kuyruk uzunluğunun diğer dozlara göre daha az olduğu görülmüştür. Buna rağmen 2.5 ppm’ lik dozda kuyruk uzunluğunun 5.0 ppm’ den daha az olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin kuyruk bölümünde görülen bu değişiklikler, normal hücredekine (DNA göçü bakımından hasarsız, Şekil-12) göre, şekil değişikliği

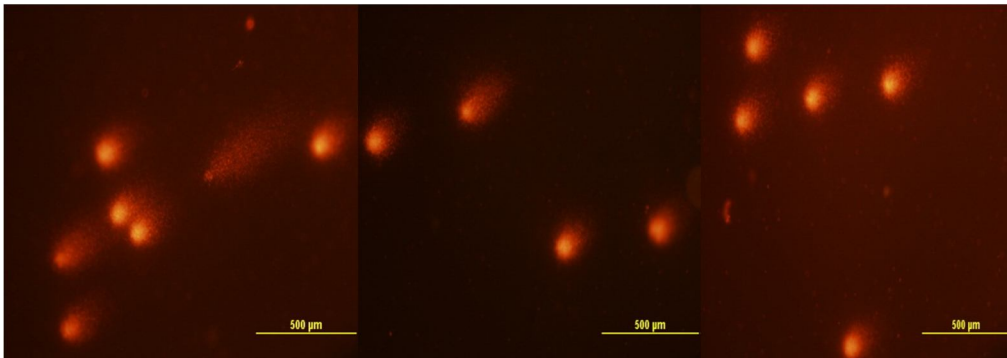
(sferik yapının giderek bozulmaya ve uzamaya meyil ettiği, Şekil-28, 29, 30) ve negatif özellikte olan DNA' nın kırık uçları elektroforez sırasında pozitif yüklü uca yani anoda doğru göç etmiştir. Elektroforez sonucunda fotoğraflarda görüldüğü gibi kuyruklu yıldız (comet) görünümü meydana gelmiştir. DNA' nın anoda doğru göçü hem DNA' daki kırık sayısına, hemde kırılan DNA' nın boyutuna bağılı olarak değişmektedir.



Şekil-28. Sorbitol' ün 1.25 ppm' lik dozu ile muamele edilen lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-29. Sorbitol' ün 2.50 ppm' lik dozu ile muamele edilen lenfosit hücreleri (x40)



Şekil-30. Sorbitol' ün 5.00 ppm' lik dozu ile muamele edilen lenfosit hücreleri (x40)

9. TARTIŞMA

Bu çalışmada temel amaç, günlük tüketimde oldukça sık kullanılan tatlandırıcıların genetik yapıda hasar oluşturup oluşturmadığını, tek hücre DNA' larının elektroforetik ortamdaki göçlerine göre analiz etmektir. Comet analiz yöntemi olarak da bilinen tek hücre jel elektroforez yöntemi son yıllarda genişleyen uygulama alanı, güvenilirliği ve uygulaması kolay olması bakımından kimyasal ve fiziksel etmenlerin canlılar üzerinde yol açtığı genotoksik ve sitotoksik etkilerinin bir göstergesi olan DNA hasar seviyelerinin ölçülmesini sağlayan önemli bir metottur.

Bu çalışmada Aspartam, Asesulfam K, Sakkarin ve Sorbitol' ün 1.25, 2.5 ve 5.0 ppm' lik konsantrasyon dozları ile 1 saat *in vitro* ortamda muamele edilen insan periferel lenfosit hücreleri incelenmiş ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırma sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Comet yönteminin temel prensibi kimyasal ve fiziksel nedenlerle oluşan genotoksik ve sitotoksik ajanların canlı hücreleri üzerindeki etkilerini, hücrelerin DNA' larını tek tek inceleyerek tespit etmektir. Genel olarak, canlı dokulardan izole edilen çekirdek içindeki DNA, ince bir agaroz jel içine fıkse edilir ve elektroforetik ortamda yürütülür. Eğer çeşitli genotoksik ajanlarla hasarlanan DNA' lar tamir mekanizmaları ile tamir edilememiş, tek veya çift DNA zincirlerinde kırılmalar oluşmuş ise farklı molekül ağırlıklarına ve farklı elektrik yüküne sahip kırılmış DNA molekülleri elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç ederler. DNA molekülleri ethidium bromid gibi DNA spesifik boyalarla boyanıp floresan mikroskop altında incelendiğinde hasarın derecesine göre DNA' lar dairesel formdan kuyruklu yıldıza benzer forma kadar çeşitli derecelerde görüntüler oluşturdıklarından yöntemle İngilizce “kuyruklu yıldız” anlamına gelen “Comet Assay” adı verilmiştir.

DNA tek ve çift sarmal kırıkları kromatin iplik yapısının değişimine neden olur. Tek sarmal kırık hasarının belirlenebilmesi için DNA çift sarmal yapısının açılması gerekmektedir. DNA hasarının tespiti için kullandığımız Comet yöntemi ile eğer hücre DNA' ları sağlam ve kırılmamış ise elektroforetik ortamda tek bir yük ve molekül ağırlığına sahip olduklarından birlikte göç edeceklerdir. Ancak, hasarlı DNA' larda bütünlük korunamadığından, kırılan DNA parçacıkları farklı yük ve molekül ağırlıklarına sahip olacaklarından, elektroforetik ortamda farklı hızlarda göç edecekler ve dolayısı ile DNA spesifik boyalarla boyandıklarında kuyruklu yıldıza benzer bir görüntü oluşturacaktır. DNA sarmal kırıklarını ölçmeye yarayan yöntemler, genellikle sarmal kırıklarına neden olan genotoksik ajanların DNA molekülünün küçülmesi

prensibine dayanır. DNA tek ve çift sarmal kırıkları kromatin iplik yapısında değişikliklere sebep olabilir. DNA tek sarmal kırığını ölçen tekniklerde DNA çift sarmal yapısının açılması gerekmektedir. Denatürasyon, çift sarmal olan DNA yapısının çözülmesi ve tek sarmal kırıklarının yanında sadece alkali ortamda açığa çıkan kırıkların tesbit edilmesi için de yüksek pH' dan yararlanılmaktadır [145]. Pek çok genotoksik ajanın DNA çift sarmal kırığına göre 5-2000 kat daha fazla tek sarmal kırığı meydana getirdiği düşünüldüğünde nötral koşulların DNA hasarını belirlemede alkali koşullar kadar etkili olmayacağı ortaya çıkmaktadır. Comet yönteminde hücreler agara gömüldükten sonra DNA çift sarmal yapısının açılması ve hücrelerin parçalanması için en az 1 saat süreyle alkali çözeltide bekletilmektedir. Böylece DNA'nın negatif yüklü kırık uçları elektroforez sırasında pozitif yüklü uca yani anoda doğru göç etmeye başlarlar. Bunun sonucunda da kuyruklu yıldız görünümü meydana gelir. DNA'nın anoda doğru göçü hem DNA'daki kırık sayısına, hem de DNA'nın büyüklüğüne bağlıdır. Kuyruk uzunluğu hasara bağlı olarak artar ancak elektroforez koşullarına bağlı olarak maksimuma ulaşır [107].

Düşük DNA hasar seviyelerinde DNA'da göçten çok yayılma gözlenirken, kırık sayısının artmasına bağlı olarak DNA parçaları kuyruğa doğru göç etmeye başlar ve çok hasarlı apoptotik hücrelerde baş ve kuyruğun tamamen ayrıldığı gözlenir. Kuyruktaki floresan şiddetinin hücrenin baş kısmına göre kıyaslanması, DNA sarmal kırıklarının sayısı hakkında bilgi edinmemiz açısından önem kazanmaktadır. Hasarsız hücrelerde çekirdek parlaktır ve floresan şiddeti hücrenin baş tarafında yoğunlaşır. Ancak DNA'da kırıklar söz konusu olduğunda floresan çekirdekten negatif yükün olduğu yöne doğru yayılarak hücrenin kuyruk bölgesinde şiddetlenir [117].

Comet testi, hasarlı hücrelerde floresanın baş taraftan kuyruğa geçişini yansıttığından DNA hasarının kantitatif olarak tespit edilmesinde kuyruk momenti, kuyruk uzunluğu ve kuyruktaki DNA yoğunluğu önemli parametrelerdir [117].

Yaptığımız çalışma sonucunda Asesulfam K' nın kontrole göre DNA hasarını artırdığı ve mutajenik olduğu belirlenmiştir. Meydana gelen bu hasarın kullanılan kimyasalın konsantrasyon artışına paralel olduğu tespit edilmiştir. Tüm comet parametreleri incelendiğinde kontrol ile dozlar arasında istatistiksel olarak önemli farkın olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında Asesulfam K' nın insan periferik lenfosit hücrelerinde mutajenik etkilerini gösteren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Buna karşılık farklı test materyalleriyle farklı çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Örneğin Bandyopadhyay ve ark. [69] Asesulfam-K' nın

S.typhimurium' un TA97a ve TA100 suşlarında mutajenik olduğunu, 150, 300 ve 600 mg/kg b.w. verilen sıçanların kemik iliği hücrelerinde DNA kırılmalarını indüklediğini saptamışlardır. Buna benzer şekilde, Mukherjee ve Chakrabarti [146] toksik olmayan dozlarda ve gavaj yoluyla Swiss albino farelerine verilen Asesulfam K' nın fare kemik iliğinde KA sayısını doza bağlı bir şekilde artırdığını saptamışlardır. Buna karşılık bazı araştırmacılar Asesulfam K' nın genotoksik ve teratojenik hasar oluşturmadığını bulmuşlardır. Durnev ve ark. [67], 5 gün boyunca oral yolla günlük 15 ve 150 mg/kg dozlarında Asesulfam K verilen C57Bl/6 farelerinde KA' nin indüklenmediğini bildirmişlerdir. Jeffrey ve Williams [68], 5×10^{-3} , 1×10^{-2} ve 4×10^{-2} M dozlarında Asesulfam K' nın sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını bildirmişlerdir. Weihrauch ve Diehl [147], yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda Asesulfam K' nın genotoksik veya kanserojenik etkiye sahip olup olmadığını söyleyebilmek için daha erken olduğunu, dolayısıyla bu yeni kuşak tatlandırıcının kesin etkisini belirleyebilmek için ilave çalışmalara gerek olduğu görülmektedir.

Asesulfam K' nın imalatında kullanılan Metilen klorür' ün insan sağlığına olumsuz etkiler yaptığı belirlenmiştir. Bu kimyasala uzun süreli maruz kalınması sonucunda baş ağrısı, depresyon, zihinsel karışıklık, karaciğer ve böbrek komplikasyonları, bulantı, görme sorunları ve kanser meydana gelebilmektedir. Ayrıca bu madde insülin salınımını uyararak kan şekerinin düşmesine neden olur. Diğer yapay tatlandırıcılarda da olduğu gibi vücudun tokluk sinyallerini karıştırarak daha fazla yenilmesine sebebiyet verir. Asesulfam K %95 metabolize olmayıp vücuttan direk olarak atılmaktadır. Buna karşılık yüksek dozlarda ve sürekli Asesulfam K tüketilmesi vücutta birikmeye neden olabilmekte, bu da genetik materyal olan DNA üzerinde hasarlara neden olabilmektedir. Yaptığımız bu çalışma ile Asesulfam K' nın düşük dozları ile 1 saat muamele edilen insan periferik lenfosit hücrelerinde DNA kırıklarının meydana gelmesi bu maddenin DNA' ya atak yapabildiğinin göstergesidir. Ancak bu sonucun kesin olarak söylenebilmesi için biyokimyasal ve genetiksel çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız diğer bir tatlandırıcı olan Aspartam diyet ürünlerinde ve şeker hastalarının kullandığı tatlandırıcılarda sıklıkla kullanılmaktadır. Aspartam' ın 1.25, 2.5 ve 5 ppm' lik konsantrasyonları insan periferik lenfosit hücrelerine 1 saat *in vitro* ortamda uygulanmış ve çalışmadan elde edilen sonuçlar diğer araştırma sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Aspartamın kontrole göre DNA hasarını

artırdığı ve mutajenik olduğu belirlenmiştir. Aspartam yüksek yoğunluklu bir tatlandırıcıdır, sindirim esterazları ve peptidazları tarafından üç normal diyet elemanına metabolize edilir: aspartik asit, fenilalanin aminoasitleri ve metanol. Aspartam'ın metabolize edilmesi sonucu oluşan aspartik asit nörotoksik etkiye sahiptir. Bununla birlikte fenilalaninin beyin fonksiyonlarına etkilediği ve metanol metaboliti formatin toksik olduğu bilinmektedir. Aspartam'ın günlük alım miktarı 40mg/kg olarak belirlenmiştir. Bu oran oldukça yüksek gibi gözükse de tüketicilerin günlük maruz kaldığı miktar ölçülememektedir. Bu durum sonucunda aspartam kullanımından sonra baş ağrısı, depresyon, panik atak, çocuklarda ishal, kısırlık, astım, böbrek ve karaciğer hasarları görülebilmektedir. Aspartam protein yapısında bir bileşik olduğu için DNA ile etkileşimi ve hücrelere maruziyeti diğer tatlandırıcılara göre daha fazla olmaktadır. Sürekli maruziyetin somatik ve gamet hücrelerinde DNA hasarı oluşturabileceği bilinmektedir. Aspartamın insan periferik lenfosit hücreleri üzerine olan etkileri ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Yapılan daha önceki çalışmalar incelendiğinde bazı çalışmalara paralel yönde sonuçlar elde etmiş olsakta bazı çalışmalar ile sonuçlarımız çelişmektedir. Örneğin Ishii [148], 104 hafta boyunca günlük 1, 2 ve 4 g/kg Aspartam ile beslenmiş sıçanlarda beyin tümörünün gelişmediğini, Ito ve ark. [64] da içme sularına 4 hafta boyunca günde %0.01 veya %0.05 oranında Aspartam katılan erkek Fischer 344 sıçanların idrar keselerinde neoplastik gelişime rastlanmadığını saptamışlardır. Durnev ve ark. [67], 40 ve 400 mg/kg dozlarında Aspartamın C57Bl/6 farelerinin kemik iliğinde klastojenik etki göstermediğini, Mukhopadhyay ve ark. [149] da Swiss albino farelerin kemik iliğinde 15 mg/kg dozunda Asesulfam K ile 35 mg/kg dozunda Aspartamın karışım halinde genotoksik olmadığını, halbuki 350 mg/kg Aspartam ile 150 mg/kg Asesulfam K'nın karışım halinde KA oluşumunu önemli derecede artırdıklarını bildirmişlerdir. Jeffrey ve Williams [68], 5×10^{-3} ve 1×10^{-2} M dozlarında Aspartamın F344 ve Sprague-Dawley sıçan karaciğer hücrelerinde DNA zararlarına sebep olmadığını saptamışlardır. Sasaki ve ark. [26], farelerin 8 farklı organı (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) ile yaptıkları Comet çalışmasında 2000 mg/kg dozunda 3 ve 24 saat Aspartam ile muamele edilen farelerin hiçbir organda DNA zararının oluşmadığını bildirmişlerdir. Kulakova ve ark. [150], Aspartam anti-mutajenik etkisini C57Bl/6 farelerinde çalışmışlardır. Araştırmacılar dioxydin ve cyclophosphan'ın farelere verilmesinden bir hafta sonra farelere 0.4-40 mg/kg dozlarında aspartam vermişler ve KA sayısını saptamışlardır. Bu çalışmaya göre Aspartamın dioxydin ve cyclophosphan'ın mutajenik etkisini

azaltmadığı yani anti-mutajenik etkiye sahip olmadığı saptanmıştır. Halbuki, Creppy ve ark. [151], Aspartamın mikotoksin olan ochratoxin A (OTA)'nın farelerde oluşturduğu toksik etkiyi engellediğini bildirmişlerdir. Ayrıca Butchko ve ark. [152] yaptıkları derleme çalışmasının sonuçlarına göre Aspartamın kanser yapıcı etkisinin olmadığını ileri sürmüşlerdir. Olney ve ark. [153], Aspartamın Sprague Dawley sıçanlarında kanserojenik etki yapabileceğini belirtmiş, FDA tarafından desteklenen bir çalışmada besin yoluyla Aspartam verilen 320 Sprague Dawley sıçanlarında beyin tümörünün oluştuğu bildirilmiş, yani Olney ve ark. [153]'nin sonuçlarını desteklemişlerdir [154]. Magnuson ve ark. [155], fare, sıçan, hamster ve köpeklerde Aspartam ile yaptıkları çalışmada Aspartamın kanserojenik olmadığını ve herhangi bir dokuda Aspartam ile kanser arasında ilişki olduğunu gösteren bir kanıt bulunmadığını bildirmişlerdir. Bandyopadhyay ve ark. [69], Aspartamın *S.typhimurium*'un TA97a ve TA100 suşlarında mutajenik olduğunu, 7, 14, 28 ve 35 mg/kg b.w. verilen sıçanların kemik iliği hücrelerinde DNA kırılmalarını indüklediğini saptamışlardır. Buna karşılık Ishii ve ark. [148], aspartam'ın sıçanlarda kansere sebep olmadığını rapor etmişlerdir. Bu çalışmalar ışığında Aspartam'ın genotoksik ve teratojenik bir ajan olduğu kesin olarak söylenememektedir. Farklı test yöntemleri ve hücreler üzerine olan etkileri araştırılmalı ve çalışmaların biyokimyasal ve genetiksel çalışmalarla desteklenmelidir.

Sakkarin için yaptığımız çalışmada bulgular göz önüne alınarak değerlendirildiğinde DNA hasarın kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artmıştır. Sakkarin'ın farklı dozları (1.25 ppm, 2.5 ppm ve 5 ppm) ile kontrol grubu arasında comet parametreleri yönünden değerlendirildiğinde anlamlı sonuçlar bulunmuştur. Sakkarin kullanımı oldukça yaygındır bunun nedeni ise ucuz ve üretiminin kolay olmasıdır. Tatlandırıcı etkisi çok yüksek olan Sakkarin, yıkılmadan %80-90 oranında sindirim kanalından emilerek organizmaya geçer. Emildikten sonra kana geçen Sakkarin çeşitli dokulara dağılır ve fazla kanlanan organlarda (böbrekler, karaciğer, akciğer) ve özellikle idrar kesesinde birikir. Sakkarinin toksik etkisi kısmen saf olmamasından kaynaklanır. Sakkarin'ın istenmeye etkileri arasında başta idrar kesesi olmak üzere kanser yapıcı etkisidir. Literatür araştırmaları sonucunda Sakkarin'ın insan periferik lenfosit hücreleri üzerine olan etkilerini gösteren çalışmaya rastlanmamıştır. Literatür incelemesinde bulgularımıza paralel yönde sonuçlar gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Ashby ve Ishidate [21] Chinese hamster akciğer (CHL) fibroblast hücreleri ile yaptıkları çalışmada Sakkarinin sodyum, potasyum, kalsiyum ve magnezyum tuzlarının KA'ni indüklediğini bildirmişlerdir. Thomas ve

ark. [22], tek doz Sakkarin verilen sağlıklı insanların idrarlarının mutajenik etkilerini Ames test sistemi ile araştırmışlardır. Sakkarin verilmesinden sonra alınan idrarların *S. typhimurium* TA98 ve TA38 suşlarında önemli düzeyde mutajenik etki oluşturduklarını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bu durumun idrar yoluyla atılan Sakkarin' in mesane kanserine sebep olmasını açıklayabildiğini belirtmişlerdir. Dawson ve Bantle [41], yaptıkları çalışmada Sakkarinin teratojenik olmadığını bildirmişler. Suzuki ve Suzuki [23], insan R5a hücreleri ile yaptıkları çalışmada Sakkarinin doza bağlı olarak mutajeniteyi artırdığını bildirmişlerdir. Sasaki ve ark. [26] farelerin 8 farklı organında (mide, kalın bağırsak, karaciğer, böbrek, mesane, akciğer, beyin ve kemik iliği) Sakkarinin DNA üzerindeki etkisini Comet Assay ile çalışmışlar 100, 1000 ve 2000 mg/kg dozlarında Sakkarin ve Sodyum sakkarin ile 3 ve 24 saat muamele edilen farelerin gastrointestinal sistemlerinde DNA zararlarının oluştuğunu bildirmişlerdir. Weihrauch ve Diehl [156], insanlarla yapılan epidemiyolojik çalışmalarda Sakkarinin mesane kanserine sebep olmadığını, ancak yüksek dozlarda Sakkarinin sıçanlarda mesane kanserini indüklediğini bildirmişlerdir. Walmod ve ark. [40] yaptıkları çalışmada Sakkarinin kuvvetli teratojen olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, Kessler ve Clark [157], 519 Sakkarin kullanan kişi ve aynı sayıda kontrol gruplarıyla yaptıkları epidemik çalışmada Sakkarinin kanserleşmeye yol açmadığını bildirmişlerdir. Leonard ve Leonard [158], Sakkarin' in in vivo genotoksik etkisini fare kemik iliği KA testi, polikromatik eritrositlerde (PCE) MN testi, spermatosit test ve dominant letal testi ile araştırmışlardır. Bunun için Sakkarin, farelere 1, 2 ve 4 g/kg dozlarında i.p.(karınzarı içine) olarak veya içme sularına 100 gün boyunca günde 20 g olarak verilmiştir. Araştırmacılar Sakkarinin tüm testlerde negatif sonuç verdiğini saptamışlardır. Aynı şekilde Eckhardt ve ark. [159], Sakkarinin *S. typhimurium* ve *Drosophila*' da mutajen olmadığını, farelerde de mikronukleus oluşumunu artırmadığını açıklamışlardır. Herbold [160], Sakkarinin *S. typhimurium* TA1535, TA100, TA1537 ve TA98 suşlarında metabolik aktivatör varlığında ve yokluğunda mutajenik etki göstermediğini saptamıştır. Takayama ve ark. [24], 25 yıl boyunca haftada 5 gün ve günde 25 mg/kg Sakkarin verilen maymunlarda idrar yollarında herhangi bir hücre proliferasyonuna rastlanmadığını bildirmişlerdir. Pecevski ve ark. [161], fare ve onların birinci kuşaklarında (F1) Sakkarin' in fertilite ve kromozomal translokasyonlar üzerindeki etkisini incelemişlerdir. İki hafta boyunca 200-500 mg/kg sakkarin verilen farelerde fertilitenin etkilenmediği ve mayoz hücrelerinde herhangi kromozomal anormalliğin meydana gelmediğini bildirmişlerdir. Bu çalışma ve veriler ışığında Sakkarin' in

kullanımına dikkat edilmesi ve çocuklarda, yaşlılarda, hamilelerde kullanılmamasına özen gösterilmesi gerekmektedir.

Sorbitol' ün Comet analizi sonucunda DNA hasarını kontrol grubuna göre artırdığı tespit edilmiştir. Fakat dozlara bakıldığında artışın doğru orantılı olmadığı görülmüştür. Hasarın 2.5 ppm' lik dozda maksimum seviyeye ulaştığı ve 5 ppm de azaldığı görülmüştür. Sorbitol şeker alkoller grubundan olup birçok bitkide de bulunmaktadır. Yapay olarak da glikozdan da hazırlanır. Emildikten sonra fruktoza dönüşerek yıkılmaktadır. Sorbitol' ün günde 30-40 gr lık dozlarda alınması ishale neden olur. Sorbitol ile yapılan çalışmalar incelendiğinde Comet yöntemi ile insan periferallenfosit hücrelerinde mutajenik etkilerini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamıştır. Yaptığımız çalışma sonucunda elde ettiğimiz veriler diğer araştırmacıların bulgularını desteklemektedir. Sorbitolün, en önemli üstünlüğü insüline gereksinim duymadan früktoz gibi metabolize olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı diyabet hastaları tarafından sıkça kullanılmaktadır. Örneğin, MacGregor ve ark. [162] früktoz/lisin karışımının oral olarak verildiğinde farelerde MN oluşumunu artırmadığını fakat, CHO hücrelerinde şiddetli klastojenik etki gösterdiğini saptamışlardır. 1,5-Ahydro-D-fruktozun fare lenfoma L5178Y hücrelerinde ve Ames testinde mutajen olmadığı saptanmıştır [163]. Johannes ve ark. [164], CHO hücrelerini 0.9 M sorbitol varlığında restriksiyon endonükleaz enzimi olan AluI ile muamele etmişler, muamele edilen hücrelerde kromozomal anormalliklerin arttığını bildirmişlerdir. Yine Johannes ve ark.[164] sorbitol'ün in vitro ortamda restriksiyon endonükleaz ile muameleden sonra DNA zararlarını indüklediğini ve dolayısıyla KA oluşumunu arttırdığını bildirilmiştir. Fakat sorbitol ile yapılan çalışmalar yeterli değildir.

Kısa süreli bir uygulama olmasına karşın, comet analizinde, özellikle kuyruk uzunluğu (tail length), kuyruktaki DNA (DNA tail) ve kafadaki DNA (head mean) verilerine bakılarak kullandığımız tatlandırıcıların DNA' larda kırıklara neden olduğu ve bu nedenle de klastojenik etkili bir toksin oldukları görülmektedir. Tatlandırıcılarımız ile ilgili negatif sonuçların gözlemlendiği çalışmalar da bulunmaktadır. Comet yönteminin temelini oluşturan DNA kırıkları kullanılan maddelerin tüm uygulama dozlarında tespit edilmiştir. DNA yapısında hiçbir değişimin meydana gelmemesi gereken yönetici molekülümüzdür. DNA' nın yapısında meydana gelen herhangi bir hasar tamir mekanizmaları ile düzeltilebilir. Ancak hasarın büyüklüğü onarım mekanizmalarının yetersizliğine neden olabilir. Tamir edilemeyen bu DNA

hasarları kalıtsal bozukluklara neden olabilmekte ve sonraki nesillere aktarılabilmektedir.

Günümüzde gıda katkı maddesi içermeyen herhangi bir ürüne rastlamak zor olduğu için aldığımız her ürünle birlikte DNA' mızın, dolayısıyla sağlığımızın tehlikeye girdiğini unutmamalıyız. Yaptığımız bu çalışma ve bundan sonra yapılması planlanan çalışmalar bu maddelerin DNA ve metabolizma üzerindeki etkilerini araştırmaya yönelik öncü çalışmalardır. Çalışmamızı destekleyici, farklı alanlarda (moleküler, biyokimyasal) çalışmaların yapılması gerekmektedir.

10. SONUÇ

Günümüzde GKM' lerinin tüketiminden kendimizi tamamen soyutlamamız mümkün değildir. Dikkat etmemiz gereken nokta, bu maddeleri yasaların belirlediği şekilde ve miktarda kullanılmasını sağlayarak tehlikeleri olabildiğince minimuma indirmektir. GKM' lerinde risk/yarar dengesi önemlidir. Ancak diğer bazı risk etkenleri ile karşılaştırıldığında, önemleri daha düşüktür. İlaç dahil her kimyasal madde toksik etki potansiyeline sahiptir. Toksisiteyi belirleyen en önemli faktör dozudur. Aspartam, Asesulfam K, Sakkarin ve Sorbitol için de bu kural geçerlidir. Bu tatlandırıcılar için bildirilen günlük alınması gereken doz aşılmamalıdır. Tatlandırıcılar sadece çay ya da kahvede kullanılmayıp günlük tüketimimizde birçok içecek ve yiyecekte kullanılmaktadır. Dolayısı ile günlük almış olduğumuz katkı maddesi maruziyeti artmaktadır ve tükettiğimiz besinlere dikkat edilmelidir. Bu tür tatlandırıcılar için ürünlerin etiketlerine, o ürünün içindeki total tatlandırıcı miktarı mutlaka okunur biçimde yazılmalıdır. Gebelerde, çocuklarda, yaşlılarda ve emzirme dönemindeki kadınlarda kullanımına dikkat edilmelidir. Özellikle suni tatlandırıcı kullanım zorunluluğu olan bireyler başta olmak üzere bütün tüketiciler günlük müsaade edilen dozdan fazla tüketiminin, tüm kimyasal maddelerde olduğu gibi, istenmeyen sonuçlar doğurabileceği konusunda bilinçlendirilmelidir. Gıda katkı maddeleri Türkiye gibi kontrollerin yetersiz olduğu, hem üreticinin hem de tüketicinin bilinçsiz olduğu toplumlarda daha büyük bir tehlike oluşturmaktadır.

Ülkemizde giderek fazla pazar elde etmeye başlayan ürünlerin başında gelmektedir yapay tatlandırıcılardır. Kimyasal yöntemlerle elde edilen ve “diyet” olarak adlandırılan bütün ürünlerde başta aspartam olmak üzere yapay tatlandırıcılar kullanılmaktadır. Diyabet hastalığı gibi özel durumlar dışında bu tür kimyasal

tatlandırıcıların çok miktarda kullanılması da sağlıklı değildir. Zira diyet tatlılar hatalı bir şekilde, kalori almadan tatlı tüketmenin bir yolu olarak algılandığından, hele hele aşırı meşrubat tüketme alışkanlığı olanlar için ciddi miktarlarda kimyasal yüklenilmesine neden olmaktadır. Bu tür tatlandırıcıların ilk örneklerinden olan Sakkarinin mesane kanserine neden olabileceği konusunda uyarıları da beraberinde getirmiştir. Bugün özellikle meşrubatlarda yaygın kullanılan Aspartam ise, vücuda alındığında sinir sistemi için uyarıcı etkileri olan aspartik asit, fenil alanin ve sinir sistemi için toksik olan metil alkole (metanol) dönüşür. Aşırı miktarda tüketilmesi çok sakıncalıdır. Tatlandırıcı amacıyla yaygın kullanılan Aspartamın pek çok kansere neden olabileceği de beş yıldır bilinmektedir [165]. Ne var ki kimyasal tatlandırıcılar tat duyusunu uyarmak açısından çok güçlü, fiyat olarak da çok ucuzdur. Bu nedenle maliyeti azaltmak adına karıştırılarak kullanılmaktadır

Her türlü GKM' nin üretimden tüketime kadar olan aşamalarında Sağlık Bakanlığı' nın hazırladığı tüzük ve yönetmeliklere uyulmalı; bu şekilde tüketime sağlıklı gıdalar sunulmalıdır.

Sonuç olarak Aspartam, Asesulfam K, Sakkarin ve Sorbitol' ün insanlar için risk oluşturabileceği ve aşırı tüketiminin bu maddelerin mutajenik etkisini artırabileceğini söyleyebiliriz. Bundan dolayı suni tatlandırıcı içeren gıdaların tüketilmesi durumunda insanların dikkatli olması, hem kendi sağlıklarının hem de gelecek nesillerin sağlıklarının korunması için özen göstermeleri gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Erdoğan, Ş (2007). Ankara Piyasasında Satışa Sunulan Bazı Gıdalarda Sentetik Boya Miktarlarının Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara.
- [2] Saldamlı, İ. (1985). Gıda Katkı Maddeleri ve İçeriyenler. Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 25, Ankara.
- [3] Yaman, M. (1996). Bazı Gıda Maddelerine Katılan Sentetik Boyaların Miktarlarının Araştırılması, Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Analizleri ve Beslenme Bilim Dalı, Ankara.
- [4] Altuğ, T. (1999). Gıda katkı maddeleri, genel başlıklar. Hekim ve Yaşam, 29-31.
- [5] Altuğ, T. ve Elmacı, Y. (2001). Gıda katkı maddeleri. Tatlandırıcılar (T. Altuğ editör) Meta Basım, İzmir, 286s.
- [6] Bayhan, A. Küçükkömürler, S. Yentür, G. (1997). Bazı Gıda Maddelerine Katılan Yapay Tatlandırıcılar Üzerinde Araştırmalar. Gıda 22: (3) 187 – 191.
- [7] Küçükköner, E. ve Kılınççeker, O. (2002). Gıda Sanayinde Kullanılan Tatlandırıcılar. Türkiye 7. Gıda Kongresi 22-24 Mayıs 2002, Ankara. 613 –624.
- [8] Hill, A.M. and Belsito, D.V., (2003). Systemic contact dermatitis of the eyelids caused by formaldehyde derived from aspartame? Contact Dermatitis, 49:258-259.
- [9] Breiteneder, H., (2004). Thaumatin-like proteins-a new family of pollen and fruit allergens. Allergy, 59: 479-481.
- [10] Hedge, V.L. and Venkatesh, Y.P., (2004). Anaphylaxis to excipient mannitol: evidence for an immunoglobulin E-mediated mechanism. Clin Exp Allergy, 34:1602-1609.
- [11] Koskela, H.O., Hyvärinen, L., Brannan, J.D., Chan, H.K. and Anderson, S.D., (2004). Coughing during mannitol challenge is associated with asthma. Chest, 125:1985-1992.
- [12] Yılmaz, E. (1999). Etiketlerde “E” leri Görmeye Alıştık, Bilim Teknik, 94-97.
- [13] Wolff, S. and Rodin, B., (1978). Saccharin-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells. Science, 200: 543-545.
- [14] Moore, C.W., Schmick, A., (1979). Recombinogenicity and mutagenicity of saccharin in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat Res., 67: 215-219.
- [15] Renner, H.W., (1979). Possible mutagenic activity of saccharin. Experientia, 15;35(10), 1364-1365.

- [16] Taylor, J.M., Weinberger, M.A. and Friedman, L., (1980). Chronic toxicity and carcinogenicity to the urinary bladder of sodium saccharin in the in uteroexposed rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54:57-75.
- [17] Cohen, S.M., Murasaki, G., Fukushima, S. and Greenfield, R.E., (1982). Effect of regenerative hyperplasia on the urinary bladder: carcinogenicity of sodium saccharin and N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide. *Cancer Res.*, 42:65-71.
- [18] Magon, G.A. and Dawson, G.W., (1982). Saccharin and the induction of presumed somatic mutations in the mouse. *Mutat Res.*, 103:49-52.
- [19] Armstrong, B.K., (1985). Saccharin/cyclamates: epidemiological evidence. *IARC Sci Publ.*, 65: 129-43.
- [20] Squire, R.A. (1985). Histopathological evaluation of rat urinary bladders from the IRDC two-generation bioassay of sodium saccharin. *Chem Toxicol.*, 23:491-497.
- [21] Ashby, J., and Ishidate, M. Jr., (1986). Clastogenicity in vitro of the Na, K, Ca and Mg salts of saccharin; and of magnesium chloride; consideration of significance. *Mutat Res.*, 163: 63-73.
- [22] Thomas, G., Garnier, R. and Fournier, E., (1986). Mutagenicity of urine after ingestion of saccharin in man. *Ann Med Interne (Paris)*, 137: 576-578.
- [23] Suzuki, H. and Suzuki, N., (1988). Mutagenicity of saccharin in a human cell strain *Mutation Res.*, 209:13-16.
- [24] Takayama, S., Sieber, S.M., Adamson, R.H., Thorgerisson, U.P., Dalgard, D.W., Arnold, L.L., Cano, M., Eklund, S. and Cohen, S.M., (1998). Long-term feeding of sodium saccharin to nonhuman primates: implications for urinary tract cancer. *J Natl Cancer Inst.*, 90: 19-25.
- [25] Takayama, S., Renwick, A. G., Johansson, S. L., Thorgerisson, U. P., Tsutsumi, M., Dalgard, D. W. and Sieber, S. M., (2000). Long-Term toxicity and Carcinogenicity Study of Cyclamate in Nonhuman Primates. *Toxicological Sciences*, 53: 33-39.
- [26] Sasaki, Y. F., Kavaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K. and Tsuda, S., (2002). The comet assay 78 with 8 mouse organs: result with 39 currently used food additives. *Mutation Res.*, 519: 103-119.
- [27] Nunes, A.P.M, De Mattos, J.C.P., Ferreira-Machado, S.C., Nunes, R.M., Asad, N.R., Dantas, F.J.S., Bezerra, R.J.A.C. and Caldeirade- Araujo, A., (2006). Biological effects of stevioside on the survival of *Escherichia coli* strains and plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 293: 187–192.

- [28] Shephard, S.E., Wakabayashi, K. and Nagao, M., (1993). Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation. *Food Chem Toxicol*, 31: 323-329.
- [29] Rencüzoğulları, E., Tüylü, B.A, Topaktaş, M., İla, H.B., Kayraldız, A., Arslan, M. and Diler, S. B., (2004). Genotoxicity of aspartame. *Drug Chem. Toxicol*, 27: 257-268.
- [30] Gurney, J.G., Pogoda, J.M., Holly, E.A., Hecht, S.S. and Prestonmartin, S., (1997). Aspartame consumption in relation to childhood brain tumor risk: results from a case-control study. *J Natl Cancer Inst.*, 89:1072-1074.
- [31] Schwartz, G.R., (1999). Aspartame and breast and other cancers. *West J. Med.*, 171:300-301.
- [32] Jemison, E.W., Brown, K., Rivers, B. and Knight, R., (1984). Cytogenetic effects of cyclamates. *Adv Exp Med Biol.*, 172: 91-117.
- [33] Sheu, C.W., Cain, K.T., Rushbrook, C.J., Jorgenson, T.A. and Generoso, W.M., (1986). Tests for mutagenic effects of ammoniated glycyrrhizin, butylated hydroxytoluene and gum Arabic in rodent germ cells. *Environ Mutagen*, 8: 357-367.
- [34] Compadre, C.M., Hussain, R.A., Lopez de Compadre, R.L., Pezzuto, J.M. and Kinghorn, A.D., (1988). Analysis of structural features responsible for the sweetness of the sesquiterpene, hernandulcin. *Experientia*, 44: 447-449.
- [35] Brusick, D., Cifone, M., Young, R. and Benson, S., (1989). Assessment of the genotoxicity of calcium cyclamate and cyclohexylamine. *Environ Mol Mutagen.*, 14: 188-199.
- [36] Kruger, C. L., Whittaker, M.H. and Frankos, V.H.,(1999). Genotoxicity tests on D-tagatose. *Regul Toxicol Pharmacol*, 29: 36-42.
- [37] Dragsted, L.O., Daneshvar, B., Vogel, U., Autrup, H. N., Wallin, H., Risom, L., Moller, P., Molck, A. M., Hansen, M., Poulsen, H. E. and LOFT, S., (2002). A sucrose-rich diet induces mutations in the rat colon. *Cancer Res.*, 62:4339-4345.
- [38] Hansen, M., Hald, M.T., Autrup, H., Vogel, U., Borholdt, J., Moller, P., Molck, A.M., Lindecrona, R., Poulsen, H.E., Wallin, H., Loft, S. and Dragsted, L.O., (2004). Sucrose and IQ induced mutations in rat colon by independent mechanism. *Mutat Res.*, 554: 279-286.
- [39] Clavert, J.M., Clavert, A., Berlizon, A., Buck, P., (1976). Period of sensitivity of the rabbit fetus to the embryopathic and lethal action of Dglucose in intraovular injection. *C R Seances Soc Biol Fil*, 170:460-3.

- [40] Walmod, P.S., Gravemann, U., Nau, H., Berezin, V. and Bock, E., (2004). Discriminative power of an assay for automated in vitro screening of teratogens. *Toxicol In Vitro*. 18:511-525.
- [41] Dawson, D.A. and Bantle, J.A., (1987) Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the frog embryo teratogenesis assay-- *Xenopus* (FETAX). *J Appl Toxicol*. 7:237-244.
- [42] Sağlam, Ö. F., (2000) Türk Gıda Mevzuatı. Semih Ofset, Ankara, s. 404.
- [43] Clauss, K.; Jensen, H., (1973) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 12,869.
- [44] <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/549acesulfame.html>
- [45] <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v16je02.htm>
- [46] <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/549acesulfame.html>
- [47] Salminen, S. and Hallikainen, A., (1990). Sweeteners. “A. L. Branen, P. M. Davidson, S. Saminen (Editör) *Food Additives*” Marcel Dekker, Inc. Newyork, 297 – 326.
- [48] Anonim (2004). Position of the American Dietetic Association: Use of Nutritive and Nonnutritive Sweeteners. *Journal of the American Dietetic Association*. 2004;104: 255–275.
- [49] Schardt, D. (2004). Sweet Nothings not All Sweeteners are Equal. *Nutrition Action Healthletter*, 8-11.
- [50] http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out52_en.pdf
- [51] Anonim (2006) b. Sweet Choices: Questions & Answers about Sweeteners in Low-Calorie Foods and Beverages. Calorie Control Council 5775 Peachtree-Dunwoody Rd., Bldg. G, Suite 500, Atlanta, 6 p.
- [52] Doğan, M. ve Boroğlu, E. (2000). Süt Endüstrisinde Aspartam E 951. Süt Mikrobiyolojisi Katkı Maddeleri. VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu Tekirdag. 479 – 483.
- [53] <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/549aspartame.html>
- [54] www.ajinomoto.ch
- [55] Artık, N., E.S. Poyrazoğlu, A. Tekin (1992). Aspartam ve Gıda Maddelerinde Kullanımı. *Fen ve Tıp Bilimlerinde Araştırma Aylık Bilim Dergisi*. Cilt 4, Sayı 39/40, Mart/Nisan 16-23.
- [56] Özbek, N. ve Yentür, G., (1993). Gıdalarda Aspartamın Katkı Maddesi Olarak Kullanılması. *Gıda* 18 (1) 67 - 71.

- [57] Öz, S. G., (2003). Aspartam: Güvenilirliği Üzerine Yapılan Tartışma. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası Cilt 56, Sayı 2, 113-120.
- [58] Pinheiro, M.V.S., M.N., Oliveira, A.L.B., Penna, A.Y., Tamime (2005). The effect of different sweeteners in low-calorie — a review. International Journal of Dairy Technology. November 2005, Vol 58, No 4, 193 – 199.
- [59] Kleinjans JCS. (1996) Food toxicity: the toxicological history of aspartame. In: Niesink RJM, Vries J, Hollinger MA, eds. Toxicology Principles and Applications. New York: CRC Press, Inc. 1055-80.
- [60] Yurdagel, Ü., (1996). Yapay Tatlandırıcıların Diyabetik Gıdalarda Kullanım Olanakları. Gıda Teknolojisi. Yıl:1 Sayı: 8, 55 -59.
- [61] Yılmaz, N., (2007). Yapay Tatlandırıcılar ve Gıda Sektöründe Kullanımları. Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- [62] Nelson, A.L., (2000). Properties of high-intensity sweeteners. In Sweeteners: Alternative–Practical Guide for the Food Industry, American Association of Cereal Chemists, ed. Saint Paul, Minnesota: Eagan Press. 17–30.
- [63] Wolf, M.M. (1979). Impotence on cimetidine treatment. New Engl. J. Med., 300, 94.
- [64] Ito, N., Fukushima, S., Shirai, T., Hagiwara, A. and Imaida, K., (1984). Drugs, food additives and natural products as promoters in rat urinary bladder carcinogenesis. Iarc Sci Publ.,56:399-407.
- [65] Dorpkin, R.H., Salo, D.F., Tucci, S.M. and Kaye, G.I., (1985). Effects on mouse embryos of in utero exposure to saccharin: teratogenic and chromosome effects. Arch Toxicol, 56: 283-287.
- [66] Lamm, L.M., Reichert, D.F. and Lamm, D.L., (1989). Rapid screening of potential human bladder carcinogens: genotoxicity in meiosis repair deficient *Drosophila melanogaster*. J Urol., 142: 1356-1358.
- [67] Durnev, A. D., Oreschenko, A. V., Kulakova, A. V., Beresten, N. F., and Seredenin, S. B., (1995). Clastogenic activity of dietary sugar substitutes. Vopr Med Khim, 41: 31-33.
- [68] Jeffrey, A.M. and Williams, G.M., (2000). Lack of DNA –damaging Activity of Five Non-nutritive Sweeteners in the Rat Hepatocyte / DNA Repair Assay. Food and Chemical Toxicology, 38: 335-338.

- [69] Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S. and Mukherjee, A., (2008). Genotoxicity Testing of Low-Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, and Saccharin. *Drug and Chemical Toxicology*, 31: 447-457.
- [70] Turner, S.D., Tinwell, H., Piergorsch, W., Schmezer, P. and Ashby, J., (2001). The male rat carcinogens limonene and sodium saccharin are not mutagenic to male Big Blue rats. *Mutagenesis*, 16:329-332.
- [71] Türkmen,. (2008). Nar suyunda gerçeklik kriteri olarak sorbitol içeriği (Yüksek Lisans Tezi) Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara,53s.
- [72] Courtehoux, D. and Lapointe, P. (1991). Polyols: a new opportunity for development in sugarfree applications sorbitol, mannitol, xylitol, lycasin. The Third International Congress On Food Industry ‘Food Additives’, 326-336. Ege Üniversitesi Gıda Müh. Böl. Bornova, İzmir.
- [73] Canımoğlu S. (2005) Gıda tatlandırıcısı olarak kullanılan Maltitol’ ün İnsan Lenfositlerinde sitogenetik etkileri. Çukurova Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 58s.
- [74] Yasa, M., (2003). Avrupa Birliği ve Gıda Katkı Maddeleri. Dünya Gıda 2003-10, 72-74.
- [75] Anonim (2006) a Gıda Maddelerinde Kullanılan Tatlandırıcılar Tebliği. Tebliğ No: 2006/45, 16s.
- [76] Anonim (2001) Türk Gıda Kodeksi Gıda Maddelerinde Kullanılan Tatlandırıcıların Saflık Kriterleri Tebliği. Tebliğ No:2001/40 17 s.
- [77] Halliwell, B., Aruoma, OI. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *Febs Lett.* 281 (1,2), 9-19.
- [78] Lindahl, T. (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat Res.* 238, 305-311.
- [79] Michikawa, Y., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato Attardi, G. (1999). Aging depended large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region on replication. *Science* , 22;286 (5440), 774-779.
- [80] S.H., Kunkel, T.A., (1999) Mutation, Mutagens, and DNA Repair Outline,ilson, The fidelity of DNA polymerase during distributive and processive DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 274, 3642-3650.
- [81] Sarkar, A., Ray, D., Shirivastava, A.N. (2006). Molecular Biomarkers: Their Significance and Application in Marine Pollution Monitoring *Exotoxicology*, 15: 333-340.

- [82] Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K. Ve Simazaki, D. (2003). Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutation Research*, 541:31-44.
- [83] Ündeğer, Ü. ve Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology* 79: 169-176.
- [84] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., (1988) A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- [85] Piperakis, S.M., Petrakou, E., Tsilimigaki, S., Sagnou, M., Monogiudis, E., Haniotakis, G., Karkaseli, H. ve Sarikaki, E. (2003). Biomonitoring with the comet assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 41:104-110.
- [86] Bilgici, B., (2005): Behçet hastalığında genotoksikite, Ondokuz Mayıs Üniversitesi. Tıp fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Samsun.
- [87] Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221.
- [88] Temizkan, G., (1994). Genetik (Temel Genetik). İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 276 s.
- [89] Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E. (1995). Sitogenetik. Ç.Ü. Fen Fakültesi, Adana, 182 s.
- [90] Kuru, M., Gözükar, S.E. (2001). Genetik. Palme Yayıncılık, Ankara, 360 s.
- [91] Cebulski-Wasilewska, A. (2003). Response to Challenging Dose of X-Rays As a Predictive Assay for Molecular Epidemiology. *Mutation Research*, 544: 289-297.
- [92] Parshad, R., Sanford, K.K., (2001). Radiation-Induced Chromatid Breaks and Deficient DNA Repair in Cancer Predisposition. *Cancer Research*, 37: 87-96.
- [93] Klug, W.S., Cummings, M.R. (2000). Concepts of Genetics. 6th ed, Prentice Hall, Chicago, 18: 25-73.
- [94] Fenech, M. (2002b). Chromosomal Biomarkers of Genomic Instability Relevant to Cancer. *Drug Discovery Today*, 22: 1128-1137.
- [95] Chatwick, K.H. (1981). The Molecular Theory of Radiation Biology. Monographs on Theoretical and Applied Genetics, Springer-Verlag, Berlin, 116s.

- [96] Fenech, M. (2000). The invitro micronucleus Tecnique, *Mutation Research* 455: 81-95.
- [97] Leal-Garza, C.H., Cerda-Flores, R.M., Leal-Elizondo, E., Cortesguiterrez, E.I. (2002). Micronuclei in Cervical Smears and Peripheral Blood Lymphocytes from Women with and Without Cervical Utherine Cancer. *Mutation Research*, 515: 57-62.
- [98] Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S. (1999). The Human Micronucleus Project-An International Collaborative Study on The Use of The Micronucleus Technique for Measuring DNA Damage in Humans. *Mutation Research*, 428: 271-283.
- [99] AU, W.W., OH, H.Y. (2000). Genetic Susceptibility to Environmental Disease and Its Impact on Qality of Life, Human Monitoring After Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents, *Life Sciences. Series A*, vol. 313, IOS Press, 312-318.
- [100] AU, W.W., Wilkinson, G.S., Tying, S.K., Legator, M.S., EL Zein, R., Halberg, L., Heo, M.Y. (1996). Monitoring Populations for DNA Repair Deficiency and for Cancer Susceptibility. *Environ Health Perspect*, 104: 579-84.
- [101] Mercier, M.J., Robinson, A.E. (1993). Use of Biologic Markers for Toxic End-Points in Assessment of Risks from Exposure to Chemicals. *Ind. Arch. Occup. Environ. Health*, 65: 7-10.
- [102] Fenech, M. (2002a). Biyomarkes of Genetic Damage for Cancer Epidemiology, *Toxicology*, 181: 411-416.
- [103] Bender, M.A., Awa, A.A, Brooks, A.L., Evans, H.J., Groer, P.G., Littlefield, L.G., Pereira, C., Preston., Wachholz, B.W. (1988). Current Status of Cytogenetic Procedures to Detect and Quantify Previous Exposures to Radiation. *Mutation Research*, 196: 103-159.
- [104] Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic Study of Radiation. *Mutation Research*, 123: 291-298.
- [105] Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E., (1990) Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the comet assay. *Radiation Research*, 122: 86-94.
- [106] Demir, S., (2010) Propolis Ekstraklarının Fibroblast Hücre Serilerinde H₂O₂ İle Uyarılmış DNA Hasarı (Genetoksisite) Üzerine Etkisinin Comet Assay Yöntemi İle Araştırılması. Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.

- [107] Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., (1988) A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184-191.
- [108] Tice, R.R., Andrews, P.W., Singh, N.P., (1990): The single cell gel assay: a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair. *Basic Life Science*, 53: 291-30.
- [109] Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Catherine, C.S., Stetina, R., (2008): The Comet Assay: Topical issues. *Mutagenesis*, 23, 3:143-151, 2008.
- [110] Collins, A.R., Dusinska, M., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, Duthie, S., Fillion, L., Panayiotidis, M., Raslova, K., Vaughan, N., (1997b): Comaet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30: 139-146.
- [111] Lee, R.F. and Steinert, S., (2003): Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544: 43-64.
- [112] Baden, J.M., Simmon, V.F., (1980): Mutagenic Effect of Inhalation Anesthetics, *Anesthesiology*, 75, 16989.
- [113] Betti, C., Davini, T., Gianessi, L., Loprieno, N., Barale, R., (1995). Comparative Studies by Comet Test and SCE Analysis in Human Lymphocytes from 200 Healthy Subjects. *Mutation Research*, 343: 201-207.
- [114] Tucker, J.B., Auletta, A., Cimino, M.C., Dearfield, K.L., Jacobsonkram, D., Tice, R.R., Carrano, A.V., (1996): Sister Chromatid Exchange: Second Report of the GeneTox Program, *Mutat. Res.*, 27, 3945.
- [115] Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Sundermann, V.M., (2004): The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566: 209-229.
- [116] Martin, V.J., Gren, M.H.L., Schmezer, P., ((1993): The Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A European Review, *Mutat. Res.*, 288, 4763.
- [117] McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., DE Meo, M.P., Collins, A. (1993). The Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay). A European Review, *Mutation Research*, 288: 47-63.
- [118] Ross, G.M., Mcmillan, T.J., Wilcox, P., Colloins, A.R. (1995). The Singel Cell Microgen Electrophoresis Assay (Comet Assay). *Technical Aspects and Aplication*

Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research. Mutation Research, 337: 57-60.

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

[120] Miyamae, Y., Iwasaki, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M., Sasaki, Y.F. (1997a). Detection of DNA Lesions by Chemical Mutagens Using the Single-Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay). 2. Relationship Between DNA Migration and Alkaline Condition, Mutation Research, 393: 107-113.

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

[122] Frenzilli, G., Betti, C., Davini, T., Desideri, M., Fornai, E., Giannessi, L., Maggiorelli, F., Paoletti, P., Barale, R. (1997). Evaluation of DNA Damage in Leukocytes of Ex- Smokers by Single Cell Electrophoresis, Mutation Research, 375:117-123.

[123] Wojwodzka, M., Kruszewski, M., Iwanenko, T., Collins, A.R., Szumiel, I. (1999). 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.

[124] Macgregor, J.T., Wehr, C.M., Hiatt, R.A., Peters, B., Tucker, J.D., Langolois, R.G., Jacop, R.A., Jensen, R.H., Yager, J.W., Shigenaga, M.K., Frei, B., Eynon, B.P., Ames, B. (1997). Spontaneous Genetic Damage in Man: Evaluation of Interindividual Variability, Relationship Among Markers of Damage and Influence of Nutritional Status. Mutations Research, 377: 125-135.

[125] Sriussadaporn, C., Yamamoto, K., Fukushi, K. Ve Simazaki, D. (2003). Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. Mutation Research, 541:31-44.

[126] Dikilitas, M. (2003). Effect of salinity & its interactions with *Verticillium albo-atrum* on the disease development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and lucerne (*Medicago sativa* & *M. media*) plants. Ph.D. Thesis, University of Wales, Swansea.

[127] Piperakis, S.M., Petrakou, E., Tsilimigaki, S., Sagnou, M., Monogiudis, E., Haniotakis, G., Karkaseli, H. ve Sarikaki, E. (2003). Biomonitoring with the comet

assay of Greek greenhouse workers exposed to pesticides. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 41:104-110.

[128] Ündeğer, Ü. ve Başaran, N. (2005). Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology* 79: 169-176.

[129] Dhawan, A., Bajpayee, M. ve Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology Toxicology*, 25:5–32.

[130] Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinka, M., Kennedy, G., Stetina, R., (1997a): The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research*, 375, 183-193.

[131] Hartmann A., Agurel, A., Beevers, C., Brendler-Schwab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A.R., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., (2003): Recommendations for conducting in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 18(1): 45-51.

[132] Fairbain, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., (1995): The Comet Assay: A Comprehensive Review, *Mutat. Res.*, 339, 3759.

[133] Baltacı V, Aygun N, Akyol D, Karakaya AE, Sardas S., (1998): Chromosomal aberrations and alkaline comet assay in families with habitual abortion. *Mutat Res.* 417: 47-55.

[134] Sardas S, Aygun N, Karakaya AE., (1997): Genotoxicity studies on professional hair colorists exposed to oxidation hair dyes. *Mutat Res* 27: 153-161.

[135] Sardas S, Walker D, Akyol D, Karakaya A. E., (1995): Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res* 335: 213-217,.

[136] <http://www.geocities.com/cometassay>

[137] Gedik, C.M., Evren, S.W.B., Collins, A.R., (1992): Single Cell Gel Electrophoresis Applied to the Analysis of UVC Damage and its Repair in Human Cells, *Int. J. Radiat. Biol.*, 62, 31320.

[138] Kassie, F., Parzefall, W., Knasmüller, S., (2000): Single Cell Gel Electrophoresis Assay: A New Technique for Human Biomonitoring Studies, *Mutat. Res.*, 463, 1331.

[139] Sardas, S., Yilmaz, M., Oztok, U., Cakır, N., Karakaya, A.E., (2001): Assessment of DNA Strand Breakage by Comet Assay in Diabetic Patients and the Role of Antioxidant Supplementation, *Mutat. Res.*, 490, 1239.

- [140] Binkova, B., Lewtas, J., Miskova, I., Rossner, P., Mrackova, M.C., Mumford, S.M., (1996): Biomarker Studies in Northern Bohemia, *Environ. Health. Perspect.*, 104, 5917.
- [141] Collins, A.R., Raslova, K., Somorovska, M., Petrovska, H., Ondrusova, A., Vohnout, B., Fabry, R., Dusinska, M., (1998): DNA Damage in Diabetes Correlation with Clinical Marker, *Free Radic. Biol. & Med.*, 25, 37377.
- [142] Kumaravel, T.S., Vilhar, B., Faux, S.P., Awadhesh, N.J., (2007): Comet assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 53-64.
- [143] Konca, K., Lankoff, A., Banasik, A., Lisowska, H., Kuszewski, T., Gozdz S, Koca, Z. ve Wojcik, A. (2003). A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutation Research* 534: 15-20.
- [144] Gichner, T., Zindar, I. Ve Szakova, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 62:186-190.
- [145] Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O' Neill, K.L. (1995): The comet assay: A comprehensive review. *Mutation Research*, 339: 37-59.
- [146] Mukherjee, A. and Chakrabarti, J., (1997). In Vivo Cytogenetic Effect On Mice Exposed to Acesulfam-K – a Non-nutritive Sweetener, *Food and Chemical Toxicology*, 35: 1177-1179.
- [147] Weihrauch, M. R. and Diehl, V. (2004). Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk?. *Annals of Oncology*, 15: 1460-1465.
- [148] Ishii, H., (1981). Incidence of brain tumors in rats fed aspartame. *Toxicol Lett.*, 7: 433-437.
- [149] Mukhopadhyay, M., Mukherjee, A., and Chakrabarti, J.,(2000). In Vivo Cytogenetic Studies on Blends of Aspartame and Acesulfam – K. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 75-77.
- [150] Kulakova, A.V., Belogolovskaia, E.G., Oreshchenko, A.V., Durnev, A.D. and Seredenin, S. B., (1999). The antimutagenic activity of aspartame. *Eksp Klin Farmakol*, 62: 48-50.
- [151] Creppy, E.E., Baudrimont, I. and Betbeder, A.M., (1998). How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *J Toxicol Sci.*, 2: 165-172.
- [152] Butchko, H.H., Stargel, W.W., Comer, C.P., Mayhew, D.A., Benninger, C., Blackburn, G.L., de Sonneville, L.M., Geha, R.S., Hertelendy, Z., Koestner, A., Leon, A.S., Liepa, G.U., McMartin, K.E., Mendenhall, C.L., Munro, I.C., Novotny, E.J., Renwick, A.G., Schiffman, S.S., Schomer, D.L., Shaywitz, B.A., Spiers, P.A., Tephly, T.R., Thomas, J.A. and Trefz, F.K., (2002). Aspartame: review of safety. *Regul Toxicol Pharmacol*, 35: 1-93.
- [153] Olney, J.W., Farber, N.B., Spitznagel, E. and Robins, L.N., (1996). Increasing brain tumors rates: is there a link to aspartame? *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55: 1115-1123.

- [154] Weihrauch, M.R., Deihl, V. and Bohlen, H., (2001). Künstliche Süßstoffe- Haben sie ein kanzerogenes Potential? Medizinische Klinik. (Munich), 96: 670-675.
- [155] Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R. And Williams, G.M.,(2007). Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. Crit Rev Toxicol. 37:629-727.
- [156] Weihrauch, M. R. and Diehl, V. (2004). Artical sweteners–do they bear a carcinogenik risk?.Annals of Oncology, 15: 1460-1465.
- [157] Kessler, I.I. and Clark, J.P., (1978). Saccharin, cyclamate, and human bladder cancer. No evidence of an association. Jama, 240: 349-355.
- [158] Leonard, A. and Leonard, E.D., (1979). Mutagenicity test with saccharin in the male mouse. J Environ Pathol Toxicol, 2: 1047-1053.
- [159] Eckhardt, K., King, M.T., Gocke, E., and Wild, D., (1980). Mutagenicity study of Remsen-Fahlberg saccharin and contaminants. Toxicol Lett., 7: 51-60.
- [160] Herbold, B.A., (1981). Studies to evaluate artificial sweeteners, especially Remsen- -Fahlberg saccharin, and their possible impurities, for potential mutagenicity by the Salmonella/mammalian liver microsome test. Mutat Res., 90: 365-372.
- [161] Pecevski, J., Vuksanovic, L., Savkovic, N., Alavantic, D. And Radivojevic, D., (1983). Effect of saccharin on the induction of 77 chromosomal translocations in male mice and their F1 offspring. Toxicol Lett, 19: 267-271.
- [162] MacGregor, J.T., Tucker, J.D., Ziderman, I.I., Wehr, C.M., Wilson, R.E. and Frideman, M., (1989). Non-clastogenicity in mouse bone marrow of fructose/lysine and other sugar/amino acid browning products with in vitro genotoxicity. Food Chem Toxicol, 27:715-721.
- [163] Yu, S., Mei, J. and Ahren, B., (2004). Basic toxicology and metabolism studies of 1,5-anhydro-D-fructose using bacteria, cultured mammalian cells, and rodents. Food Chem Toxicol, 42: 1677-1686.
- [164] Johannes, C., Boes, R. and Obe, G., (1992). Uptake of the restriction endonuclease AluI by Chinese hamster ovary cells measured by frequencies of induced chromosomal aberrations: effect of hypertonic concentrations of glycerol and sorbitol. Mutagenesis, 7: 225-232.
- [165] Soffritti M, Belpoggi F, Esposti DD, Lambertini L, Tibaldi E, Rigano A. (2005) Firts experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. Environ Health Perspect; 114: 379-85.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Zeynep FINDIKLI
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 30/06/1985
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Gökcebostan Mah. Bostan sok. A Giriş No: 12 Sivas
E-posta Adresi	zeynepfindikli@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise	Divriği Lisesi
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi

EKLER

EK-1 Etik Kurul Raporu



T.C.

Cumhuriyet Üniversitesi

TIP FAKÜLTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KURULU

Konu:

Sayı: 2010/98

07.07.2010

Karar No: 2010-04/04

Yüksek Lisans Öğrencisi Zeynep FINDIKLI'nın "Bazı Gıda Katkı Maddelerinin İnsan Periferik Lenfosit Kültürü Üzerine Olan Etkisinin Comet Yöntemi İle Belirlenmesi" konulu Yüksek Lisans Tezinin Bilimsel Araştırmaları Değerlendirme Kurulunca uygun olduğuna;

Karar verilmiştir.

Ünvanı/Adı Soyadı	Üye	Uzmanlık Dalı	İmzası
Prof.Dr.M.Kemal YILDIRIM	Başkan	Farmakoloji	
Prof.Dr.Dilara İÇAĞASIOĞLU	Üye	Çocuk Sağ.ve Hast.	katılmadı
Prof.Dr.Ayhan KOYUNCU	Üye	Genel Cerrahi	katılmadı
Doç.Dr.Sefa GÜLTÜRK	Üye	Fizyoloji	
Doç.Dr.Yavuz SİLİĞ	Üye	Biyokimya	katılmadı
Yrd.Doç.Dr.Gülay YILDIRIM	Üye	Deontoloji	
Yrd.Doç.Dr.Ziynet ÇINAR	Üye	Biyoistatistik	

ANKET FORMU

Adı-Soyadı:

Yaş:

Cinsiyet:

Kilo:

Mesleği:

1. Sigara kullanıyor musunuz?

Evet ()

Hayır ()

2. Son 10 yıl içerisinde iş yerinizde ya da evinizde herhangi bir kimyasal maddeye solunum yoluyla ya da doğrudan deri teması ile devamlı maruz kaldınız mı?

Evet ()

Hayır ()

Kimyasal Maddenin ismi:

Ne kadar süre önce maruz kaldığı:

Maruziyet sıklığı:

3. Bulunduğunuz ortamda (ev ya da işyeri) sigara içiliyor mu?

Evet ()

Hayır ()

Kaç kişi içiyor:

4. Alkollü içecek kullanıyor musunuz?

Evet ()

Hayır ()

Sıklık:

Miktar: Bardak/gün:

5. Kendinizde ya da ailenizde bir genetik hastalık var mı?

Evet ()

Hayır ()

Hastalığın adı:

6. Son iki yılda geçirdiğiniz hastalıklar nelerdir?

Hastalığın adı:

Ne kadar süre önce geçirdiği:

7. Son bir yılda yaptırdığınız aşılar nelerdir?

8. Son bir yılda radyolojik tetkik yaptırdınız mı?

Evet ()

Hayır ()

Kaç kez :

Zamanı:

9. Son iki ay içinde kullandığınız ilaçlar nelerdir ve ne kadar süre kullandınız ?

10. Son altı ayda uzun süreli olmak üzere vitamin kullandınız mı?

Evet ()

Hayır ()

Vitamin türü:

11. Yemek yeme alışkanlığınız nasıl?

Sebze ağırlıklı ()

Et ağırlıklı ()