



**T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ**

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

**SODYUM BENZOATIN KORYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM)
MODELİNDE ANJİYOGENEZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE
ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Elina DİNÇ

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN**

**ALANYA
2022**

**ELİNA
DİNÇ**

**SODYUM BENZOATIN KORYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) MODELİNDE
ANJİYOGENEZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE**

ETKİLERİ

ALKÜ 2022

T.C.
ALANYA ALAADDİN KEYKUBAT ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**SODYUM BENZOATIN KORYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM)
MODELİNDE ANJİYOGENEZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ**

Yüksek Lisans Tezi

Elina DİNÇ

Anabilim Dalı: Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Program Adı: Yüksek Lisans

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN

ALANYA

2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Elina DİNÇ'in "Sodyum Benzoatın Koryoallantoik Membran (CAM) Modelinde Anjiyogenez ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri" başlıklı tezi 26/08/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Moleküler Tıp Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Unvanı-Adı Soyadı		İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Enes SÖZEN	
Üye	: Doç. Dr. Öğr. Üyesi Hasan Basri SAVAŞ	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Durkadın DEMİR EKŞİ	
Üye	:	
Üye	:	

.....

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Elina DİNÇ
İmza

TEŞEKKÜR

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi'nde yapmış olduğum seminer çalışmam sonucunda elde ettiğim bilgileri dikkatinize sunmaktayım. Detaylıca işlediğim çalışmamda Sodyum Benzoat'ın Koryoallantoik Membran (CAM) Modelinde Anjiyogenez ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri 'ne yer vermekteyim.

Çalışmam süresince bilgi birikimi ve tecrübeleriyle, konu seçimi dahil olmak üzere araştırmanın yürütülmesinde yardım eden öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ENES SÖZEN' e,

İlgi, alaka ve desteğini esirgemediği için saygı değer hocam Doç. Dr. Öğr. Üyesi Hasan Basri SAVAŞ'a,

Moleküler Tıp Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan bütün değerli hocalarıma,

Erdem, tevazu, saygı sözcüklerinin anlamlarını ve insana nasıl yakıştığını bana göstererek; hiçbir zaman dürüstlüğümden ödün vermeden de yolumda ışıklar olabileceğini bana öğreten annem, babam ve kardeşime,

Kısa zamanda tanıyıp birçok şey paylaştığım yüksek lisansın bana kazandırmış olduğu arkadaşlarıma sonsuz teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

SODYUM BENZOATIN KORYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) MODELİNDE ANJİYOGENEZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ

Elina DİNÇ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü,

Ağustos 2022 (58 sayfa)

Sağlıklı besin elde etmek üzere gıdaların işlenme aşamasında birçok ilave unsur kullanılmaktadır. Gıdanın üretimi ve taşınması aşamalarında eklenen maddelere gıda katkı maddesi adı verilmektedir. Gıdalarda, katkı maddelerine başvurulma nedeni besinin farklı kaynaklar veya etmenlerden kirlenmesinin önüne geçilmesidir. Gıda katkı maddeleri koruyucular, besin katkı maddeleri, renklendirici maddeler, tatlandırıcı maddeler, tekstüre edici maddeler ve çeşitli maddeler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Gıda katkı maddelerinden olan Sodyum Benzoat (SB) genel olarak alkollü içeceklerde, meyve ve sebze sularında, gazlı meşrubatlarda, alkollü-alkolsüz içeceklerde, konservelerde, çeşitli soslarda ve kozmetik ürünlerinde küf, maya, bakteri oluşumunu inhibe etmek maksadıyla kullanılan benzoik asidin sodyum tuzu olarak tanımlanmaktadır. Her maddenin fazla tüketilmesi toksik etki göstermektedir. İşlenmiş gıdalara eklenen kimyasal maddelerin bazıları etik açıdan sorunlu kabul edilmektedir. SB'nin gıda katkı maddesi olarak kullanımıyla ilgili pek çok endişe bulunmaktadır.

Bu çalışma tavuk embriyosunda koryoallantoik membran (CAM) modeli kullanılarak anjiyogenez ve oksidan-antioksidan aktivitelerin test edilip taranması suretiyle gıda katkı maddelerinden, SB'nin olası yan etkileri ve sebep olabileceği sonuçları gözlemlemek amacıyla tasarlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Sodyum benzoat, Koryoallantoik Membran, Gıda Katkı Maddesi, Oksidan, Anti-oksidan, Anjiyogenez.

ABSTRACT

THE EFFECTS OF SODIUM BENZOATE ON ANGIOGENESIS AND OXIDATIVE STRESS IN THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE (CAM) MODEL

Elina DİNÇ

Department of Molecular Medicine

Graduate School of Alanya Alaaddin Keykubat University,

August, 2022 (58 Page)

Many additives are used in the processing of foods to obtain healthy food. Food additives are the substances that are added during the processing and transportation of food and are called as food additives. The purpose of using food additives is to prevent contamination of food from various sources and factors. Food additives are classified as preservatives, nutritional additives, coloring agents, flavoring agents, texturizing agents and various substances. Sodium Benzoate (SB), one of the food additives, is defined as the sodium salt of benzoic acid, which is generally used in alcoholic beverages, fruit and vegetable juices, carbonated soft drinks, alcoholic and non-alcoholic beverages, preserves, various sauces, and cosmetics products to inhibit the formation of mold, yeast and bacteria. Excess consumption of each substance shows toxic effects. Some of the chemicals added to processed foods are considered ethically problematic. There are many concerns about the use of SB as a food additive.

This study was designed to observe the possible side effects and possible consequences of Sodium Benzoate from food additives by testing and screening angiogenesis and oxidant-antioxidant activities using the chorioallantoic membrane (CAM) model in chicken embryos.

Key words: Sodium Benzoate, Chorioallantoic Membrane, Good ingredient, Oxidant, Anti-Oxidant, Angiogenesis.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR VE SEMBOLLER	x
1.GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Beslenme ve Gıda	1
1.2. Gıda Katkı Maddeleri.....	1
1.2.1.Gıda katkı maddelerinde numaralandırma	3
1.3. Besinlerdeki Toksik Öğeler	5
1.3.1. Besinlere katılacak gıda katkı miktarlarının belirlenmesi	5
1.4. Serbest Radikaller	6
1.4.1. Oksidatif stres.....	6
1.4.2. Reaktif oksijen türleri	7
1.5. Antioksidanlar.....	9
1.6. Sodyum Benzoat	10
1.6.1. Sodyum benzoat'ın kimyasal yapısı	11
1.6.2. Sodyum benzoat çalışmaları	12
1.7. Bevacizumab	16
1.8. Koryoallantoik Membran (CAM)	18
1.8. 1. CAM evreleri.....	18
1.9. Anjiyogenez.....	20

1.9. 1. Fizyolojik anjiyogenez.....	20
1.9. 2. Patolojik anjiyogenez.....	21
2. MATERYAL METOD.....	23
2.1. Deney Hayvanları	23
2.2. Sodyum Benzoat	23
2.3. Deney Gruplarının Düzenlenmesi	23
2.4. Deney Prosedürü.....	24
2.5. Biyokimyasal Ölçümler.....	27
2.6. Anti-anjiyogenez Skorlama	28
2.7. İstatiksel Yöntemler	28
3. BULGULAR.....	30
3.1. İstatistik Analiz Bulguları	30
3.2. İstatistiksel Grafikler	35
3.3. Anjiogenezin Değerlendirilmesi	38
4. TARTIŞMA	43
5. KAYNAKLAR	46
6- EKLER	56
EK-1. İntihal Raporu.....	56
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Sodyum benzoat çözelti içeriği.	23
Tablo 2.2. Deney gruplarının düzenlenmesi.	24
Tablo 2. 3. Koryoallantoik membrandaki anti-anjiyogenik etkileri araştırmak için kullanılan skor değerleri.	28
Tablo 3.1. Biyokimyasal analiz sonuçları.	30
Tablo 3.2. Post Hoc Tests (Deney Sonrası) Çoklu Karşılaştırmalar (TAC).....	31
Tablo 3. 3. Post Hoc Tests (Deney Sonrası) Çoklu Karşılaştırmalar (TOC).	32
Tablo 3. 4. Post Hoc Tests (Deney Sonrası) Çoklu Karşılaştırmalar (OSI).	34
Tablo 3.5. Anti-anjiyogenik skor.	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 1. Sodyum benzoatın kimyasal yapısı.	11
Şekil 1. 2. Şizofrenide sodyum benzoatın faydalı etkilerinin özeti.	16
Şekil 1. 3. Enine bir CAM bölümünde α -düz kas aktininin (koyu kahverengi) immünohistokimyasal görseli.....	19
Şekil 1. 4. Kan damarlarının filizlenmesinin sebep olduğu tümör genişlemesi ve sonrasında küçük tümör durumundan kılcal kan damarları ile filizlenip büyüyen tümöre doğru oluşum.	21
Şekil 2.1: Kuluçka makinesi.	24
Şekil 2.2 : Enjektör yardımıyla döllenmiş tavuk yumurtasından serum alınması	25
Şekil 2.3. Çözelti hazırlanma aşaması.	26
Şekil 2. 4. Model içerisine yerleştirilmiş pelletin lokasyonu.	27
Şekil 3. 1. Gruplara ait TAS ortalama ve standart sapma değerleri grafiği.	35
Şekil 3. 2. Gruplara ait TOS ortalama ve standart sapma değerleri grafiği.	36
Şekil 3. 3. Gruplara ait OSİ ortalama ve standart sapma değerleri grafiği.	37
Şekil 4. 1. Bevacizumab uygulanan modelde kuvvetli anti-anjiyogenez etki.	39
Şekil 4. 2. SB 10^{-3} grubunda orta şiddette anti-anjiyogenez etki.	40
Şekil 4. 3. SB 10^{-4} grubunda orta şiddette anti-anjiyogenez etki.	41
Şekil 4. 4. SB 10^{-5} grubundaki zayıf anti-anjiyogenez etki.	42

KISALTMALAR VE SEMBOLLER

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABTS Radikali	3-Etilbenzothiazollin-6-Sulfonik Asit
ADI	Günlük Alınmasına İzin Verilen Miktar
ANOVA	Tek Yönlü Varyans Analizi
AU	Arbitrary Unit
CAM	Koryoallantoik Membran
CAT	Katalaz
CD28	Farklılaşma Kümesi 28
CD95	Farklılaşma Kümesi 95
Dll-4	Delta-Like Ligand 4
EC	Endotel Hücre
EC	Avrupa Yönetmeliği
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörleri
GMP	İyi Üretim Uygulamaları
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen
GSH	Glutasyon
GSH-RD	Glutasyon Redüktaz
H2O2	Hidrojen Peroksit
HCT116	Kolon Kanseri Hücre Hattı
HO2	Perhidroksil Radikali

HOCl	Hipokloröz Asit
IgG	İmmünoglobülin G Antikoru
INS	Uluslararası Numaralandırma Sistemi
MDA	Malondialdehit
Na ₂ O	Sodyum Oksit
NaB	Sodyum Benzoat
NF-Kb	Nükleer Faktör Kappa B
NO	Nitrik Oksit
NOEL	Hiçbir Etkinin Gözlenmediği Doz
NR2B	N-metil D-aspartat reseptör alt tipi 2B
Nrp-1	Neuropilin-1
O ₂	Singlet Oksijen
O ₂ • ⁻	Süperoksit Radikali
OH	Hidroksil
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PAFA	Öncelik Tabanlı Değerlendirmesi
ROS	Radyoaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SB	Sodyum Benzoat
SD	Standart Sapma
SOD	Süperoksit Dismutaz
TAS	Total aAtioksidan
TGK	Türk Gıda Kodeksine

Tie-2	Anjiyopoietini Bağlayan Reseptör
TOS	Total Oksidan
UVB	Ultraviyole A
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü



1.GENEL BİLGİLER

Sağlığın esasını dengeli ve kaliteli beslenme oluştururken; toplumun birçok açıdan ilerleyebilmesi de o toplumu oluşturan insanların sağlıklarıyla yakından ilişkilidir. Hayat boyunca insan sağlığı ve yaşam kalitesinin yükseltilmesi amaçlanmalıdır [1].

1.1. Beslenme ve Gıda

Gıda sektöründe yüksek kar elde etmek için nüfus artışı göz önüne alınarak, besinlerin raf ömrünü ve lezzetini arttırma yönünde girişimler gerçekleştirilmektedir [2]. Tüm bunlar meydana getirilirken sağlıklı besin olgusu dikkat edilmesi gereken en önemli unsurdur. Kastedilen, besleyici özelliğini kaybetmemiş; fiziksel veya kimyasal açıdan bozulmamış temiz gıdalardır. Güvenilir besin diye nitelendirdiğimiz sağlıklı besin eldesi için işlenme aşamalarının tamamında gıdanın çeşitli kaynaklar ve etmenlerden kirlenmesinin önüne geçilmesi amaçlanmalıdır [3].

Türk Gıda Kodeksine (TGK) göre gıda; tütün ve sadece ilaç olarak kullanılanlar hariç olmak üzere; içkiler ve çikletler ile hazırlama ve işleme gereği kullanılan maddeler dâhil olmak üzere insanlar tarafından yenilen ve içilen ham, yarı veya tam işlenmiş her türlü maddedir [4].

1.2. Gıda Katkı Maddeleri

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) tanımlamasında ilave maddeler, aslında gıda olarak faydalanılmayan ve gıdanın karakteristik bir ögesi olacak şekilde kullanılmayan, besleyici özelliğinin var olup olmamasına bakılmaksızın, bir gıdaya kasıtlı olarak eklenen herhangi bir maddedir. Bu tür gıdaların imalatı, hazırlanması, işlenmesi, paketlenmesi, taşınması veya depolanmasında teknolojik bir amaç için gıdanın ya da yan ürünlerinin direkt veya endirekt olarak bu gıdanın bir parçası haline gelmesiyle sonuçlanması veya makul olarak sonuçlanması beklenebilir” [5]. Genel olarak gıda katkı maddeleri, Aralık 2008 tarihli ve 1333/2008 sayılı Avrupa Yönetmeliğine (EC) bağlıdır [6].

Birleşik Devletler’ de, FDA olarak bilinen Gıda ve İlaç Dairesi şeklinde ifade edilen kuruluş, ilgili idari ve kimyasal bilgileriyle birlikte 3000’den fazla gıda katkı maddesinin açık olarak güncellenmiş bir listesini tutmaktadır [7]. Gıda katkı maddelerinin güvenliği FDA tarafından sürekli olarak güncellenmektedir. Gıda katkı

maddeleri işlevlerine göre; tat artırıcılar, antioksidanlar, koruyucular, stabilizatörler ve emülgatörler, renklendirici maddeler olarak kategorize edilmektedir. Gıda katkı maddeleri sınıfından olan koruyucular, antimikrobiyaller, antioksidanlar ve esmerleşme önleyici maddeler olarak alt bölümlere ayrılmıştır. Renklendirici maddeler azo bileşiklerini, kinofalon türevlerini, triarilmetan bileşiklerini, ksantenleri ve indigoları kapsar; aroma maddeleri arasında tatlandırıcılar, doğal ve sentetik aromalar ve aroma artırıcılar yer alır. Son olarak, tekstüre edici ajanlar emülgatör ve stabilizatör olarak ikiye ayrılır [5]. Yaklaşık olarak 1800 tat artırıcının da dahil edildiği, ABD (Amerika Birleşik Devletleri) gıdalarında kullanım için onaylanmış olan 3000 ve daha fazla sayıda gıdalara eklenen katkı maddesi bulunmaktadır [8].

Avrupa yönetmeliğinde ve Türk Gıda Kodeksinde belirtilen benzer tanımsal ifadelerle göre gıda katkı maddeleri “olmayan herhangi bir madde” şeklinde ifade edilmektedir. Aslında yalnız başına besin olarak kullanılmayan, gıdanın karakter özelliğini yansıtan bir eleman olarak değerlendirilmeyen katkı maddeleri; paketlenme, üretim veya işleme safhalarında doğrudan ya da dolaylı yollarla gıdanın bir parçası haline getirilmesi ile sonlanır veya uygun olarak sonuçlanması hedeflenir. Tuz, şeker, aminoasitler, tatlandırıcılar veya jelatin gibi bazı maddeler bu kategoriye girmemektedir [9],[10].

Gıda yoluyla vücudumuza giren hastalık oranı son yıllarda oldukça artmıştır. Başta süt ve süt ürünleri olmak üzere hayvansal kaynaklı bu gıdaların tüketilmesi sonucu oluşan hastalıklar yeni doğan bebeklerde menenjit ve gebelerde düşük gibi önemli kötü sonuçlara sebep olmaktadır bununla birlikte sebep olan patojen bakteri hayvanlardan insanlara bulaşabilmektedir. Bu tür ciddi patojen oluşumlarının önüne geçilmesi için katkı maddesi kullanımına başvurulmaktadır [11].

Gıda katkı maddeleri gıdaya; üretiminin, işlenmesinin, paketlenmesinin, taşınmasının veya depolanmasının herhangi bir aşamasında eklenen maddeler olarak tanımlanmaktadır. Şu anda dünya çapında doğal olarak ve sentetik olarak bilinen pek çok gıda katkı maddesi kullanılmaktadır. Önceleri gıda katkı maddelerinin doğal kaynaklı olduğu savunulmaktayken zaman ilerledikçe sentetik katkı maddeleriyle tanışılmış ve bunlar daha baskın hale gelmiştir. Her ne kadar sentetik katkı maddelerinin tüketiminin ilk bakışta insan sağlığı için daha büyük risk oluşturduğu düşünülse de bazı çalışmalar içeriğindeki protein sebebiyle doğal kaynaklı gıda katkı maddelerinin bağışıklık aracılığıyla advers reaksiyonlara neden olma olasılığının daha yüksek olduğunu göstermektedir [7].

Gıda katkı maddelerinin bazıları astım, ürtiker ve anjiyoödem ve anafilaksi gibi advers reaksiyonların kaynağı olarak kabul edilmektedir [12]. Buna rağmen bazı gıda katkı maddelerinin kullanımından kaçınmak daha önemli sorunlar ortaya çıkarabilmektedir. Örneğin bakteri veya mantar kontaminasyonunu önleyen koruyucular veya gıdanın bozulmasını ve sertleşmesini önleyen ajanlar olmadan gıda dağıtımı insan sağlığı için ciddi şekilde risk oluşturmaktadır [13].

İşlenmiş gıdalara binlerce farklı kimyasal ilave edilmektedir ve bu katkı maddelerinin bazıları etik açıdan sorunlu kabul edilmektedir. Araştırmacılar tarafından yaklaşık 200 gıda katkı maddesi ile ilgili belirli tüketiciler için akut intoleransa veya alerjik reaksiyonlara neden olduğu veya kanser gibi uzun vadeli ciddi hastalık risklerini önemli ölçüde artırdığı ile ilgili şüpheler  ne sürülmektedir [14].

1.2.1.Gıda katkı maddelerinde numaralandırma

Antik ağlardan 1820' ye kadar gıdalara katkı maddesi eklemek kişisel sorumluluk içeren ve muhtemelen küçük işletmeler tarafından gerçekleştirilen bir eylem olarak görülmekteydi. Yıllar içinde 1800'lerden başlayarak Amerika Birleşik Devletleri'nde ve dünyanın diğer bazı ülkelerinde gıda katkı maddelerinin kullanımının ciddiyeti artmış ve yeni bilimsel bilgilere dayanan daha verimli yaklaşımlar uygulanmasına karar verilmiştir. Gıdaların kasıtlı biçimde farklı maddelerle karıştırılması 1920'lere kadar ciddi bir sorun olmuş ve halkın kafası çeşitli sebeplerle karıştırılmış, ayrıca bu durum sürekli bir endişe halini almıştır. 1950'lerde Amerika Birleşik Devletleri'nde gıda katkı maddesi kullanımına ilişkin yetkili uygulamaların halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmadığına genel olarak inanılsa da aksi görüşte olanlar bunu tartışma haline getirmiş ve bu durum endişe olarak varlığını sürdürmüştür [15].

1961'de Theodore Roosevelt, orijinal Gıda ve İlaç Yasasını imzalayarak yasalaştırmıştır. Bu yasa, yanlış etiketlenmiş veya karıştırılmış; uyulurucu, yiyecek ve içeceklerin eyaletler arası ticaretini yasaklamaktadır [8]. 1913 tarihli Gould Değişikliği, gıda paketlerinin dışında ağırlık, sayısal veri veya ölçünün düz ve göze çarpan bir şekilde işaretlenmesini gerektirmektedir. 1927'de ABD Kimya Bürosu'nun yeniden düzenlenmesi, düzenleyici bir kurum olarak Gıda, İlaç ve Böcek İlaçları İdaresi'nin (daha sonra Gıda ve İlaç İdaresi [FDA] olarak kısaltılmıştır) kurulmasıyla sonuçlanmıştır. 1938 tarihli Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası'nın geçişi, gıdalardaki kaçınılmaz toksik maddeler için güvenli tolerans aralığı sağlamak amacıyla

mekanizmalar oluşturmuştur. Bu yasa, gıdaların kimliği ve kalitesine ilişkin standartları belirtmektedir. 1940'ta FDA, Tarım Bakanlığı'ndan Federal Güvenlik Ajansı'na devredilmiş ve Walter G. Campbell ilk Gıda ve İlaç Komiseri olmuştur.

FDA, Gıda Katkı Maddelerinin ncelik Tabanlı Değerlendirmesi (PAFA) adlı bir program aracılığıyla gıda katkı maddeleri hakkındaki idari, kimyasal ve toksikolojik bilgileri düzenleyip izlemektedir. Genel olarak tehlikesiz olarak onaylanmış bileşenler (Generally Recognised As Safe: GRAS) GRAS olan maddeler, gıda katkı maddesi olarak kullanılmak için FDA izni gerektirmemektedir. Bunun aksine, 1958'den sonra insanlara veya hayvanlara potansiyel zarar verdiğine dair kanıtlarla piyasaya sunulan tüm maddeler, FDA incelemesine ve araştırmasına tabi tutulur [8].

Gıda yoluyla oluşan hastalıklar, başta tüketiciler olmak üzere ve gıda sanayisi yetkilileri açısından her zaman önemli bir endişe kaynağıdır. Alternatif gıda koruyucuları olarak hizmet edebilecek doğal ürünler çokça tercih edilmektedir. Bu sebeple antimikrobiyal ajanların doğal kaynaklardan elde edilmesine yönelik çalışmalar süregelmektedir [16, 17].

Dünya genelinde kabul edilen kodlandırma sisteminde, gıda katkı maddeleri numaralandırılırken “European” sözcüğünün baş harfi olan “-E” ile kodlandırılma yapılmaktadır. Bu sebeple genel olarak kabul görmüş biçimde Uluslararası Numaralandırma Sistemi (INS)’nde her besinin katkı maddesi numarası bulunmaktadır. Ülkemizde de hayli amaçla faydalanılan 300 ve daha fazla sayıda besinlere eklenen katkı maddesi bulunmaktadır. Kullanım amaçlarına göre numaralandırıldığında gıda katkı maddeleri: Renklendirmek amaçıyla kullanılanlar E100 - E180, gıdayı herhangi bakteriyel enfeksiyondandan veya bozulma gibi durumlardan korumak amaçıyla kullanılanlar E200 - E285, antioksidan aktivite sergilemesi amaçıyla kullanılanlar E300 - E321, jelleştirmek ve kalınlaştırmak amaçıyla kullanılanlar E400 - E495, talandırmak amaçıyla kullanılanlar E950 - E959 aralığında kodlar ile ifade edilmektedir [18].

Ortalama olarak sanayileşmiş ülkelerde her tüketicisi, gıda üreticilerine yaklaşık 12 sterline mal olan 7-8 kg gıda katkı maddesi tüketmektedir. Yıllık 30 milyar dolara yaklaşan küresel pazar açısından, katkı maddelerinin %40'ı tadı, %30'u dokuyu ve %5'i görünümünü etkilemek için kullanılmaktadır. Tüketicileri bakteriyel gıda zehirlenmesinden ve gıda kalitesinin hızlı bozulmasından korumak için, yaklaşık %20'si işleme yardımcıları olarak hizmet eder ve yalnızca %5'i güvenlik nedenleriyle eklenmektedir. Koruyucu olarak kullanılan bu %5'lik kısım bakterilerin büyümesinin engellenmesinde çok önemlidir [14].

1.3. Besinlerdeki Toksik Ögeler

Bilinen tüm kimyasal maddelerin, tehlikesinin en az olarak kabul edilen güvenli dozundan fazla tüketilmesiyle birlikte toksik etkiler göstermesi muhtemeldir. Herhangi bir tehlikeyle karşılaşmamak için her maddenin güvenli kabul edilen dozda tüketilmesi gerekmektedir. Tüm bunlar göz önüne alındığında kimyasal maddenin sadece tehlike durumuna göre, söz konusu kimyasala temas veya maruziyet sonucunda oluşabilecek duruma göre değerlendirme yapılmasının yanı sıra maruz kalınan doz göz önüne alınarak bilgilendirme yapılması doğrudur. Günümüzde bu değerlendirmelerin çoğunlukla kimyasal maddenin tehlike niteliğine göre yapılması yanlıştır [19]. Maruz kalınan her maddenin, dozunun aşılmasına bağlı olarak toksik etkiler göstermesi olasıdır [20].

1.3.1. Besinlere katılacak gıda katkı miktarlarının belirlenmesi

1. Deney hayvanı çalışmaları ile çalışma sonucunda toksik veya kimyasal maddenin söz konusu deney hayvanların ortalama % 50'sinin ölümüne neden olan dozun belirlenmesi için katkı maddesine maruziyet gerçekleştirilir.

- i. Doz - cevap durumunun araştırılması için deney hayvanına uygulanan doz gittikçe azaltılarak, belirlenen dozlarda katkı maddesinin sebebiyet verdiği durum, emilim ile atılım rapor edilir.
- ii. Çalışılan organizmanın maruziyet sonrasında hücre, doku ve organları incelenir.

2. Araştırma sonuçlarında test edilen katkı maddesinin etki etmediği veya hiçbir etkisinin gözlenemediği herhangi bir doz aralığı bulunmadığında kullanılmasına izin verilmemektedir. Bu tür bir durumda NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) olarak ifade edilen hiçbir etkinin gözlenmediği konsantrasyon tespit edilir. Bulunan NOAEL doz ile deney hayvanının yaşamının % 85'ini ifade edecek sürede farklı organlarında toksik, kanserojenik, oksidatif, mutajenik ve alerjik etkilenmenin gözlenmediği günlük alım oranı, organizmanın kilogram ağırlığına düşen katkı maddesinin miligramı olarak saptanmaktadır.

3. Alınabilecek en fazla madde miktarının belirlenmesi için diğer aşamada gıdanın üretim teknolojisinin gerektirdiği miktarın çerçevesinde eğer GMP (Good Manufacturing Practices- İyi Üretim Uygulamaları) miktarı ile ADI (Acceptable Daily Intake - Günlük alınmasına izin verilen miktar) oranı aşıyor ise bu katkı maddesinin kullanılması uygun bulunmaz ve izin verilmez [18].

1.4. Serbest Radikaller

Yaşam boyu gerçekleştirebildiğimiz iş yapabilme yeteneği, büyüme ve gelişme gibi fizyolojik olayların tamamı enerji sayesinde gerçekleşmektedir [21]. Enerji elde etmek üzere kullanılan oksijenin bir kısmı maalesef vücut için sakıncalı maddelere dönüşmektedir. Bunlar serbest radikal olarak adlandırılmaktadır ve yapılarında eşleşmemiş elektron bulundurmaları sebebiyle reaktif karakterlidir. Bu moleküller başka moleküllerden elektron alma veya elektron verme eğilimindedir. Oksidanlar ve antioksidanlar arasında, oksidanlar lehine bir dengesizlik oluştuğunda bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmakta ve sonucunda moleküler düzeyde hasar meydana gelmektedir [22].

1.4.1. Oksidatif stres

Vücudumuzdaki oksidanların artışı ya da antioksidanların azalması bu dengesizliğe sebep olabilir. Dışardan vücudumuza aldığımız antioksidan özellikli çeşitli besinler sayesinde doğal yollardan oksidatif stres ile baş etmek mümkündür [23]. Bu sebeple son yıllarda, bilim insanları ve halk fonksiyonel gıdalara ve nutrasötiklere yönelmektedir [24].

Günümüzde ilaç ve gıda ürünlerinde kimyasal tüketimi giderek artmıştır. Bu sebeple, sağlıklı beslenme ve vücudun toksik maddelerden korunabilmesi maksadıyla işlenmemiş gıdalara ilgi gittikçe artış göstermektedir. Doğal olarak oluşan bileşiklerin gıda maddelerinde yararı olduğuna dair çok sayıda araştırmalar yapılmıştır ve çalışmalar halen devam etmekte olup daha fazla maddelerin tanımlanmasına, fayda ve yan etki durumunun incelenmesine ihtiyaç vardır [21, 25].

Oksidatif metabolizma sırasında oksijen kullanılırken, enerji eldesi için suya indirgendiğinde oksijenin bir kısmı serbest radikallere dönüşür [26]. ROS (Radyoaktif Oksijen Türleri) vücutta birçok fizyolojik işlev görmekle beraber ROS seviyesindeki oldukça düşük miktardaki geçici artışlar bile birçok sinyal yollarını etkilemektedir. ROS üretimi fizyolojik olarak işlev gördüğü miktarları oksidan-antioksidan dengeyi bozacak şekilde arttığında oksidatif stres oluşmaktadır. Yani oksidatif stres terimi artmış ROS'u ve/veya antioksidan seviyedeki azalmayı ifade etmektedir. ROS antioksidanlar tarafından kompanse edilebilecek seviyeleri aştığında canlıda potansiyel hasara yol açmaktadır. Oksidan-antioksidan dengenin uzun süreli bozulması durumunda artmış durumdaki ROS proteinlere, nükleik asitlere, lipitlere, miyelin kılıfı ve nöronlara zarar vermektedir [27, 28]. Artmış ROS seviyeleri kanser hücrelerinde NF-kB (Nuclear Factor

kappa B) ve survivin, cIAP1 gibi onun hedef genlerine benzer sağ kalım sinyal yollarını aktive ederek antiapoptotik etki göstermektedir [29].

1.4.2. Reaktif oksijen türleri

Vücutta ROS' un oluşumu ve onların sebep olduğu hasarları önlemek amacıyla antioksidan savunma sistemi görev almaktadır. Antioksidanlar etkilerini göstermek için serbest radikalleri kavrayıp onları başka bir moleküle dönüştürebilirler. Onlarla birleşerek etkilerini düşürebilir veya onları kendilerine bağlayarak aralarındaki tepkime zincirini kırarak antioksidan aktivite gösterebilmektedir [30, 31].

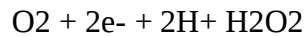
1.4.2.1. Süperoksit radikali



Süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet -}$) proteinlerle reaksiyona girerek yapılarına zarar vermeden redoks durumlarını değiştirdiği açıklanmıştır. Süperoksit, dokulara ciddi hasar verebilmesinin yanı sıra [32]; süperoksit dismutazların, oksijen toksisitesine karşı biyolojik savunmanın temel bileşenleri olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır [33].

Buna rağmen süperoksit üretiminin hücre bölünmesini tetikleyip maligniteye ya da apoptoza sebep olabilmektedir [32]. Tüm bunlar göz önüne alındığında süperoksitten iyi huylu bir radikal olarak bahsedilebilmektedir. Süperoksitin radikal bir yutucu olarak hareket etme yeteneği, süperoksit dismutazın koruyucu rolüne katkıda bulunabilir [34].

1.4.2.2. Hidrojen peroksit



Oksijen molekülünden iki elektron indirgenmesi ile oluşan hidrojen peroksit, sebest radikal olarak nitelendirilmemektedir. Sebebi ise yapısında eşlenmemiş elektron bulunmamasıdır [35].

Hidrojen peroksit (H_2O_2), vücudun hücrel savunma sistemi tarafından üretilen ve istilacı mikroorganizmalara karşı aktif olan çeşitli reaktif oksijen türlerinden biridir. Hidrojen peroksit, oksijen salınımı yoluyla antimikrobiyal etkiler gösterebilmektedir. Hidrojen peroksitin antimikrobiyal ajan olarak %3'lük sulu bir solüsyon halinde dezenfektan şeklinde yaygın olarak kullanılmaktadır [36].

Hidrojen peroksit fazla olduğunda, hücrelere ve dokulara zarar verebilmektedir. Redoks sinyallerini veya stres tepkilerini başlatan eksojen H_2O_2 örnekleri mevcuttur ve reseptör aracılı redoks sinyalinin, endojen olarak üretilen H_2O_2 'yi kapsadığı yaygın olarak kabul edilmektedir [37].

1.4.2.3.Hidroksil radikali



Hidroksil (OH) radikalleri, proteinlerdeki, özellikle fibrinojendeki disülfid bağlarını azaltabilmektedir. Bu durum proteinlerde açılmalara ve yeniden katlanmalara neden olabilmektedir. Reaksiyonun sonuçları ateroskleroz, kanser ve nörolojik bozukluklar gibi birçok hastalıkta görülmekte ve indirgeyici olmayan maddelerin etkisiyle önlenmektedir [38].

1.4.2.4. Nitrik oksit

Nitrik oksit (NO) , birçok yönüyle canlılığı etkileyen önemli gaz ve sebest radikaldir. Nitrik oksit sentazın özdeş formları ile L-Arginin'den sentezlenmektedir [39]. NO homeostazındaki herhangi bozulma durumunda, yüksek tansiyon, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli olumsuz sonuçlar doğabilmektedir [40].

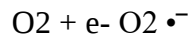
NO, kardiyovasküler hastalıkların başlamasına ve ilerlemesine karşı korunmada önemli rol oynar. NO' nun kardiyoprotektif rolleri, kan basıncının ve vasküler tonusun düzenlenmesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu ve düz kas hücresi proliferasyonunun önlenmesini içerir [41].

1.4.2.5. Hipokloröz

Hipokloröz asit (HOCl), insan vücudunda esas olarak inflamasyon bölgelerinde nötrofiller ve monositler tarafından salgılanan mieloperoksidaz tarafından üretilmektedir [42].

HOCl, oksidasyon ve klorlama tepkimelerine katılır. Oksidasyon için birçok biyolojik hedefi bulunmaktadır. Nötrofiller aracılığıyla üretilir ve kuvvetli oksidan etki göstermektedir [43].

1.4.2.6. Oksijen radikali



Singlet oksijen (O_2) aynı zamanda hem aktive edilmiş lökositlerin aracılık ettiği süreçler hem de radikal sonlandırma reaksiyonları dahil olmak üzere bir dizi reaksiyon ile üretilebilmektedir [44].

O_2 , çeşitli biyolojik molekülleri kolayca oksitleyen oldukça reaktif, kısa ömürlü bir ara maddedir. O_2 'in biyokimyasal üretiminin, bir dizi biyolojik süreçte görülen yıkıcı etkilere katkıda bulunduğu öne sürülmektedir [45].

1.4.2.7. Alkil radikali

Alkil radikalleri, organik sentez için anahtar ara maddelerdir [46]. Birincil aminler, organik moleküllerde bulunan en baskın fonksiyonel gruplardan biridir. Bu varlıklar, doğal ürünlerin, biyoaktif moleküllerin, sentetik yapı taşlarının ve katalizörlerin kimyasal mimarisini oluşturmaya yardımcı olur. Her yerde bulunmaları nedeniyle, deaminasyon süreçleri yoluyla C–C veya C–X bağlarının inşası için stratejilerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır [47].

1.4.2.8. Perhidroksil

Perhidroksil radikali (HO_2), süperoksit radikalının protonlanmış bir formudur [48]. Meydana gelen H_2O_2 radikalının reaktivitesi oldukça yüksektir [49].

1.4.2.9. Alkoksil radikali

Alkoksil radikallerinin bozunması aldehitler veya ketonlarla birlikte serbest alkil radikalleri ürettiği için bu ürünler karakteristiktir [50]. 80 siklik peroksit bağı iki alkoksil radikali üretmektedir. Alkoksil radikallerinden biri, bir epoksit ve hidroperoksit oluşturmak için konjuge çift bağlar üzerinde 3-ekzosiklizasyona uğrar. Diğer alkoksil radikali, bir alkol oluşturmak üzere bir hidrojen atomunu soyutlayabilmektedir [51].

1.5. Antioksidanlar

Vücudumuz, serbest radikal gibi çoğu durumlarda bizlere zarar verecek potansiyelde olan oksidanlara karşı doğal olarak enzimatik ve enzimatik olmayan savunma sistemi geliştirmiştir [52]. Düşük seviyelerde sahip olduğumuz antioksidanlar ve antioksidan enzimlerinin inhibisyonu, oksidatif strese ve bunun sonucu olarak hücrel hasara yol açmaktadır. Neticesinde oksidanlar lipit proteinlerini oksitleyerek DNA mekanizmaları tarafından tersine çevrilemez boyutta hasara neden olmaktadır. DNA'ya verilen hasar bu durumda mutasyonlara ve yüksek ihtimalle kansere neden olur ayrıca protein yapı bozulmaktadır [53]. Serbest radikallerin olası tehlikesinden dışardan besin yoluyla vücuda antioksidan alımıyla korunulabilmektedir [52].

Antioksidanlardan enzimatik olmayanlar glutatyon, karotenoidler, A,C,E vitaminleri, alfa lipoik asit, biyoflavonoidler, mineraller, ürik asit, koenzim Q10, B vitaminleri ve albüminler olarak örneklendirilmektedir. Enzimatik olan antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon redüktaz (GSH-RD), katalaz (CAT) şeklinde belirtilmektedir [54].

Gıdalarda koyucu olarak sınırlı biçimde kullanılabilen antioksidan ürünlerden; oksidanların sebep olabileceği toksik etkilerden ve tat değişiminden koruyabileceği gibi raf ömrünü uzatmak amacıyla da faydalanılmaktadır [55]. Yapılan çalışmalarda bu bileşiklerin birçoğunun biyokimyasal etkileri, bazılarının ise dokular veya hücre sistemleri üzerinde farmakolojik etkileri gözlenmektedir [56].

1.6. Sodyum Benzoat

Kuru erik, tarçın, karanfil gibi besinlerde benzoik asit mevcuttur. Kimyasal formülü $C_6H_5CO_2H$ olarak ifade edilir. Benzoik asit, sodyum tuzu olarak bilir. Günümüze kadar gıda koruyucusu olarak faydalanılmaktadır [57]. Sodyum Benzoat (SB) genel olarak alkollü içeceklerde, meyve ve sebze sularında, gazlı meşrubatlarda, alkollü-alkolsüz içeceklerde, konservelede, çeşitli soslarda ve kozmetik ürünlerinde; küf, maya, bakteri oluşumunu inhibe etmek için kullanılan benzoik asidin sodyum tuzu olarak tanımlanmaktadır [58]. SB' nin antimikrobiyal aktivitesinden üst düzeyde yararlanılması için düşük pH ortamına ihtiyaç duyulmaktadır. Uygun aralık pH 4.5 şeklinde kabul edilip, % 0.1 oranında SB yeterli bulunmaktadır [59]. Gıdanın korunması amacıyla kullanılan söz konusu katkı maddesinin insan sağlığı açısından tam olarak güvenli olup olmadığı hakkında endişeler bulunmaktadır [60]. Yapılan araştırmalar SB katkı maddesinin çocuklarda alerji gelişimine neden olabildiği ayrıca sinirsel iletim ve özellikle bilişsel işlevi tehdit edici nitelikte olduğunu kanıtlamaktadır [61].

Benzoatlar, hidroksil radikalini temizlemektedir. Emilimlerinin oldukça hızlı olmasının yanında glisin kaynaklarını tüketebileceği göz ardı edilmemelidir [62]. Ayrıca gıda katkı maddesi olarak kullanılan SB'nin böbrekler aracılığıyla hippurat üretmek amacıyla mitokondri içerisinde metabolize edildiği bildirilmektedir [63].

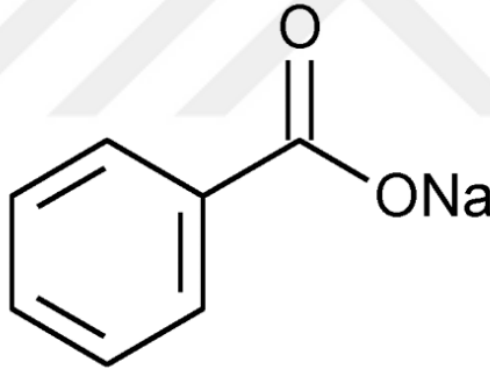
SB' nin vücuda alınmasıyla beraber bağırsak döngüsü meydana gelmekte, sonrasında gıda ürünlerinin sindiriminde önemli role sahip olan tripsine bağlanıp, tripsinin yeniden yapılanmasına sebebiyet vermektedir [64]. Çalışmalara göre SB' nin yüksek oranda kullanımı histamin ve prostaglandin salınımı sonucunda mide mukus salgısının değişimiyle ülsera neden olmaktadır. 2007 yılında sıçanlar ile gerçekleştirilen çalışmada SB uygulaması sonucunda kan basıncı artmış ve kan damarlarında yırtılma saptanmıştır. Hücre membranında tahribat, karaciğer ve böbrek gibi hayati organlarda fonksiyon bozukluğu SB tüketiminin diğer olumsuz etkileri olarak gösterilmiştir. Araştırmalar alkolsüz içecekler ve meyve sularında metal katalizörlerin de etkisi ile

benzoik asit ve askorbik asit arasındaki reaksiyon sonucunda benzen oluştuğunu göstermektedir [64].

Üre döngüsü bozuklukları olan hastalarda SB epizodik hiperamonyemi tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. SB, atık nitrojen bertarafı için, üregenez için alternatif yollar sağlar ve bu şekilde hastalarda nitrojen homeostazının korunmasına yardımcı olduğu gözlenmektedir. Araştırmalara göre SB, hippurat oluşturmak için glisin ile konjuge olmaktadır, glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyon yoluyla hızla idrarla atılmaktadır [65].

1.6.1. Sodyum benzoat'ın kimyasal yapısı

Gıda katkıları listesinde E211 olarak kodlanan SB' nin kimyasal formülü $C_7H_5O_2Na$ olup, moleküler ağırlığı 144.1 g/mol olan beyaz granül veya kristal şeklinde kokusuz bir toz olup, etanol ve su içerisinde mükemmel bir çözünürlüğe sahiptir [58, 59]. SB, benzoik asitten yaklaşık olarak 200 kat daha fazla (sırasıyla 0°C, 20°C ve 100°C'de , 100 ml suda 62.8, 66.0 ve 74.2 g çözünür) daha fazla çözündüğü için besin koruyuculuğu açısından tercih edilmektedir [59].



Şekil 1. 1. Sodyum benzoatın kimyasal yapısı [66].

ABD Gıda ve İlaç İdaresi' nce güvenilir olarak nitelendirilen SB farmakolojide üre döngüsü bozuklukları, karaciğer hastalıkları, multiple skleroz, şizofreni, erken evre alzheimer hastalığı ve parkinson hastalığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır [67]. Bunlarla birlikte yüksek miktarlarına maruz kalmayla özellikle de beyin nöro kimyasını olumsuz yönde etkileyebilecek bir glisin eksikliği yaratma potansiyeline sahip olduğundan dikkatle yaklaşılmalıdır [61]. Fakat çeşitli araştırmaların mevcut sonuçlarına göre SB'ye karşı aşırı duyarlık reaksiyonlarının nadir olduğu savunulmaktadır [68]. Ayrıca antimikrobiyal ajan olarak gıda kaplamalarında geniş bir kullanıma sahiptir [69]. Bazı araştırmalarda aşırı sodyum maruziyetinin çocuklarda

benzoat kaynaklı ürtikere, [63] egzama, anjiyoödem, eksfoliyatif dermatit, irritabl bağırsak sendromuna sebep olduğu belirtilmektedir [66].

Fareler üzerinde yapılan çalışmalar da yüksek dozda SB maruziyetinin öğrenmeyi ve özellikle sinir sistemi hassas olan çocuklarda nörolojik bozukluklara yol açabileceğini göstermektedir [70]. Akut toksisitesi oldukça düşük olan SB' nin ürtiker ve astımı olan hastalarda düşük dozajlarda alerjiye sebebiyet verdiği kanıtlanmıştır fakat sağlıklı bireylerde bu oranın çok daha düşük olduğu bildirilmektedir [71]. Araştırmalar yalnızca nadir hastaların bu ajanlara gerçekten duyarlı olduğunu göstermiştir [72].

SB maruziyeti sonucunda olası yan etkiler arasında bulantı, kusma ve epigastrik rahatsızlık gibi gastrointestinal semptomlarla birlikte hoş olmayan tuzlu bir tat ve yutulma durumunda yanma hissi yer almaktadır. SB ısıtıldığında zehirli Sodyum Oksit (Na_2O) dumanları yaymaktadır [62, 73].

1.6.2. Sodyum benzoat  alışmaları

Toz haldeki SB 'nin, askorbik asit içeren ürünlerle karıştırılması veya SB haplarının toz halinde SB içeren içeceklerle yutulması [73], ayrıca kısa süreli maruz kalınmasıyla beraber gözlerde, ciltte ve solunum yollarında tahrişe neden olmakta, ancak uzun süreli veya tekrarlanan temaslar yüksek cilt hassasiyetine neden olmaktadır [64]. Türk Gıda Kodeksi tarafından gıdalarda, SB' nin 100 mg/ml oranında kullanılmasının herhangi bir genotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir [74].

Gıda koruyucularından Sodyum Nitrit ile Potasyum Sorbat; Sodyum Nitrit ile SB kombinasyonlar halinde değerlendirilmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları, koruyuculardan SB' nin diğer koruyucularla birlikte kullanımının tek olarak kullanımından daha fazla antimikrobiyal etki gösterdiğine dikkat çekmektedir. Bunlara bakılarak daha yüksek dozlarda tek tür koruyucunun kullanımının tercih edilmesindenise kombinasyon halinde daha düşük dozlarda koruyucuların kullanımı önerilmektedir [75].

Hazır gıda ürünlerinde koruyuculuk için kullanılan SB katkı maddesiyle, antioksidan olarak kullanılabilen bir diğer madde olan C vitaminin (askorbik asit) birlikte kullanımının insan sağlığını üzerindeki olası etkileri araştırılmıştır. Çalışmaya göre hazır içeceklerde sıcaklığın artmasıyla beraber SB ve C vitamininin birlikte reaksiyona girerek, hastalıkların oluşumu tetikleyen, kanser riskini artıran benzen oluşumunu indüklediği gözlenmektedir [76].

Gıda katkı maddesi olan SB' ye oral dermal ve/veya inhalasyon yolu ile maruziyet sonucunda en fazla etki ciltte olmak üzere kronik ürtikeri  iddetlendirdiği, astım, rinit, dermatit veya anafilaktik  ok gibi vakaların gözlendiği bildirilmektedir [68].

SB' nin klastojenik, mutajenik ve sitotoksik olduğu ve SB' nin önemli ölçüde DNA hasarını artıracak olduğu bildirilmektedir [77]. Baş ağrısı olan hastalarda oral yolla kafein ve SB tedavisi ile hastalarda ağrının %70 oranında azaldığı gözlenmektedir [78].

SB' nin T ve B hücreleri üzerindeki etkileri in vitro olarak araştırıldığında SB'nin splenositlerdeki CD28 (Cluster of Differentiation 28) ve CD95 (FasR, apoptoz antijeni 1, farklılaşma kümesi 95) ko-stimülatör belirteçlerinin ekspresyonunu aşağı regüle ettiği gözlenmektedir. Çalışma sonuçları SB' nin, G1' de hücre döngüsü durmasıyla desteklenen T ve B lenfositlerinin fonksiyonel tepkilerini baskıladığını ortaya koymaktadır. SB' nin neden olduğu immün supresyonun, adaptif bağışıklığın aktivasyonunda ve düzenlenmesinde hayati bir rol oynayan çeşitli aktivasyon reseptörlerinin, yardımcı reseptörlerin, yardımcı uyarıcı moleküllerin ve düzenleyici sitokinlerin ekspresyon modellerinin modülasyonundan etkilendiği ortaya konulmaktadır [67].

Salsa sosunda SB' nin bilinen başka bir koruyucu madde olan potasyum sorbat ile eşit miktarla ayrı ve kombinasyon halinde maruziyetin, SB kullanımının diğer koruyucularla kıyaslandığında *Zygosaccharomyces Bailii* e karşı koruyuculuğunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir [79].

Zebra balığı ile gerçekleştirilen bir organogenez olayının izlenimi sırasında SB maruziyetinden kaynaklanan bağırsak kusurları seyredilmiştir. Kusurlar, yetişkinlerde gözlenmemesine rağmen erken embriyogenez durumunda SB' ye maruz kalındıktan sonra nörotoksisite ve teratojenitelerin indüklendiğini düşündürmektedir [80].

Farelerde oral yolla, tavşanlarda deri altına olacak şekilde yüksek dozda SB' nin uygulandığı araştırma SB tüketiminin hiçbir kanserojen etkisi olmadığını göstermektedir [81]. Bir başka çalışmaya göre sirozlu veya portalsistemik şanlı hastalarda akut hepatik ensefalopati ataklarının tedavisinde etkili olduğu gözlenmiştir. SB tedavisi ile nörolojik anormalliklerde ve entelektüel yeteneklerde nesnel ve istatistiksel olarak anlamlı iyileşme ve arteriyel amonyak konsantrasyonunda azalma meydana gelmiştir. SB tedavisi alan 30 hastada mental durumda iyileşme gözlenmiştir [82].

Alzheimer hastalığı gözlenen hastalara, değişken oranlarda 24 haftalık süre için SB uygulandığında bilişsel işlev alanında iyi bir performans sergilediği bildirilmektedir [83].

Güvenli olarak kabul edilmiş olan SB katkı maddesinin akut maruziyeti sonucunda hippurat asetilglisin ve antranilik asiti önemli ölçüde etkilediği ve glisinde düşüşe neden olduğu saptanmıştır [63].

SB 'nin beyindeki glutatyon (GSH)'u azalttığı ve malondialdehit (MDA) seviyesini önemli ölçüde artırdığı ve bununla beraber hafıza ve motor koordinasyonunu önemli oranda bozduğu ve nörolojik hasara neden olduğu bildirilmektedir. Çocuklarda hiperaktivite ve dikkat eksikliğinin yüksek miktarda SB maruziyeti ilgili olabileceği belirtilmektedir [70].

SB' ye subkronik olarak maruz bırakılan sıçanların 90 günlük süre sonucunda ölüm oranlarının %50 olduğu ve kilo alımında yavaşlama, karaciğer ve böbrek ağırlığında nispi artışlar ve bu organlarda patolojik değişiklikler tespit edilmektedir [84].

HCT116 (kolon kanseri hücre hattı) kolon kanser hücrelerinin SB ile inkübasyonu neticesinde hücre canlılığında azalma, kaspaz 3/7 enzim aktivitesinde anlamlı olarak artma, SB' nin, apoptozda görev alan NF-kB proteininin sitozolden çekirdeğe göçü üzerinde artırıcı etki sergilediği ve böylece SB' ye bağlı apoptotik etkilerin SB' nin üzerinde NF-kB aktive edici etkilerinden kaynaklanabileceği ortaya konulmaktadır [85].

Çocukluk çağında ADI ((Acceptable Daily Intake) - Günlük Alınmasına İzin Verilen Miktar) dozunda SB maruziyetinin anksiyeteyi artırdığı, motivasyon kaybına sebep olduğu gözlenirken, NOAEL dozunda SB kullanımı ile moleküler düzeyde öğrenme reseptörlerinden NR2B (N-metil D-aspartat reseptör alt tipi 2B) konsantrasyonunu arttırdığı gözlenmektedir[86]

SB kullanılarak tavuk embriyoları üzerinde yapılan çalışmalarda, damar yapısında bozulma, ödem oluşumu, karaciğerde histolojik değişimler ve embriyolarda gelişim hasarı gözlenmektedir [87].

Gıda koruyucularından olan SB ve potasyum benzoatın in vitro genotoksik etkilerinin araştırıldığı çalışmada bu katkı maddeleri, kromozomal anormalliğe ve mikronükleus frekansında doza bağlı olarak anlamlı bir artışa neden olmaktadır. Bu araştırma test edilen katkı maddelerinin kromozomal boyutta mutajenite etkilerinin olduğunu göstermektedir [88].

SB' nin keşfedilmemiş özelliklerini vurgulamak amacıyla gerçekleştirilen araştırma sonucunda mevalonat yolunu baskıladığı için, farelerde in vivo olarak kolesterolü; kolesterol düşürücü bir ilaç olan pravastatin ile karşılaştırılabilir bir seviyede düşürmeyi başardığı gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre, SB'nin nörodejeneratif bozukluklarda terapötik müdahale için birincil veya ek tedavi olarak önerilmektedir [89].

Sıçan ve farelerde SB 'ye uzun süreli maruziyet ile, mevcut deney hayvanlarının karaciğer ağırlığında artış ve karaciğerde serum klinik parametrelerinde değişiklikler saptanmaktadır [90].

Kornea neovaskülarizasyonunun tedavisinde Sarah B. ve arkadaşlarının bevacizumab intrastromal enjeksiyonu ile tedavinin cerrahi olarak değerlendirilmesi sonucunda neodamarlarda kısmi gerileme, azalmış opak görüş ve görmede netlik gözlenmektedir. Çalışmada yan etki gözlenmemesiyle birlikte, bevacizumabın görmeyi stabilize etme ve kornea nakli prognozunun iyileştirilmesi için ek tedavi olarak kullanımı önerilmektedir [91].

Bevacizumabın anti-anjiyojenik özelliği 16 erkek Long Evans sıçanı üzerinde araştırılmıştır. Gözlere günde iki kez 4 mg/ml bevacizumab damlatılmıştır. Dijital olarak fotoğraflananan kornealar analiz edildiğinde, bevacizumab ile tedavi edilen kornealarda, kornea alanları hesaplanmıştır. Sonuçlarda 4 mg/ml dozunda bevacizumabın kimyasal yararlanımında korneal neovaskularizasyonu düşürdüğü gözlenmektedir. [92].

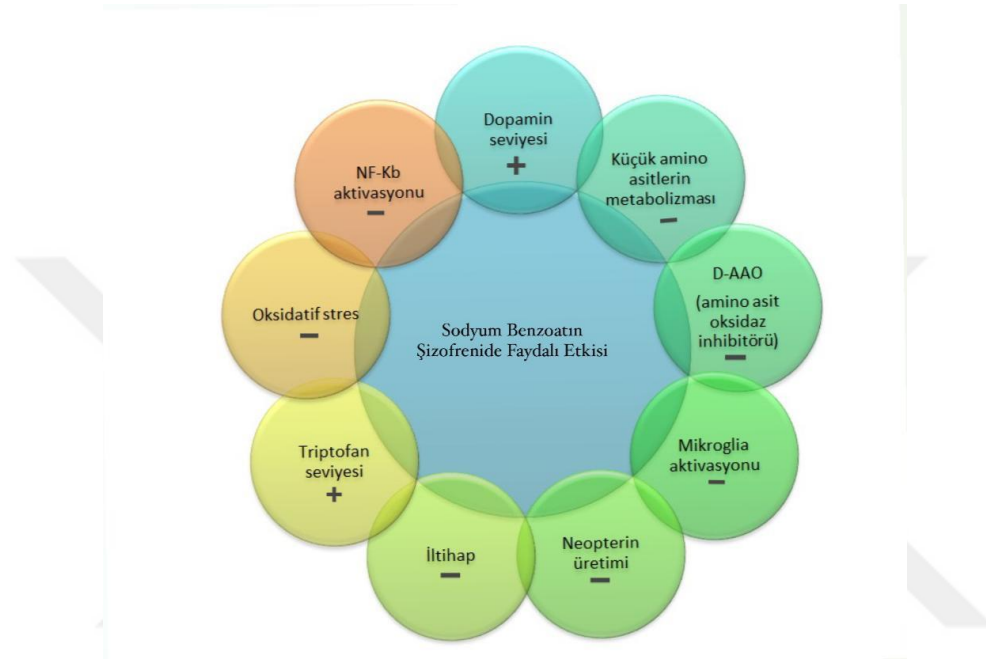
Deneysel anjiyogenez araştırmalarında kornea, makroskopik gözlemde kolaylık sağlaması nedeniyle tercih edilen modellerden biridir. Kornea antioksidan düzeylerini araştırmak için gerçekleştirilen Bilgihan ve arkadaşlarının çalışmasına göre, deneysel olarak oluşturulan apoptozisli korneanın, antioksidan enzim aktivitelerinde azalma gözlenmiştir [93].

UVB (Ultraviyole B) muamele edilmiş farelerde, kafein ve kafein + SB uygulanması ile SB' nin güneş ışığına maruziyet öncesi veya sonrası topikal uygulamalarının insanlarda güneş ışığına bağlı olarak gerçekleşebilen cilt karsinogenezini ve skuamöz hücreli karsinomları engellediği gözlenmiştir [94].

Sodyum benzoat ile ilgili araştırmaların geneline bakıldığında şizofreni, depresyon, nörodejeneratif hastalıklar gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde faydalandığı

verileri sunulmaktayken; doğurganlığı azalttığı, oksidatif stres oluşturduğu, endokrin sistemi bozduğu gibi tehlikeli sonuçlar da mevcuttur [95].

Tüm bunlara bakılarak SB' nin olumsuz etkilerinin olduğu gibi olumlu etkilerinin de olduğu ve olası olumsuz etkilerinin yanı sıra yararlı etkilerinin varlığı üzerine de çalışmaların süre geldiğini anlamaktayız.



Şekil 1. 2. Şizofrenide sodyum benzoatın faydalı etkilerinin özeti ("-" engelleme/azalma; "+" artma) [95].

1.7. Bevacizumab

Kanseri önlemede anjiyogenezi inhibe etmenin etkili olabileceği fikri uzun yıllar önce üzerinde çalışılan bir konudur. Bu tür stratejiler vasküler endotelial büyüme faktörünün (VEGF) izole edilmesine yol açmıştır. Endotel hücrelerinin yüzeyindeki reseptör tirozin kinazları aktive eden VEGF' nin, normal ve patolojik kan damarı büyümesinin anahtar düzenleyicisi olduğu bilinmektedir. 1990'ların başında, VEGF' ye karşı bir monoklonal antikor kullanıldı ve VEGF ile indüklenen anjiyogenezin inhibisyonunun, in vivo olarak tümör büyümesini belirgin şekilde bastırdığı gözlemlendi. Tüm bu çabalar bevacizumabın geliştirilmesine yol açmıştır [96].

Anjiyogenezin, kanser büyümesi ve yayılması açısından önemli bir süreç olması nedeniyle anjiyogenezin inhibisyonu kanser tedavisinde üzerinde durulan bir konudur

[97]. Bevacizumab, VEGF-A' nın biyolojik aktivitesini bağlayan ve inaktive eden, anjiyogenezi, dolayısıyla tümör büyümesini ve proliferasyonunu inhibe eden bir rekombinant monoklonal antikordur. VEGF' nin tüm aktif izoformlarını inhibe eden, moleküler ağırlığı 149 kDa olan hümanize bir antikordur [98].

Bevacizumab, Çin hamsterı yumurtalığında DNA teknolojisiyle üretilmiş, insanlarda kullanımı uygun hale getirilmiş olan bir monoklonal IgG (İmmüoglobülin G) antikorudur. Bevacizumab, VEGF-A' nın endotel hücresine bağlanmasını önleyerek VEGF-A' nın tüm izoformlarını hedef almaktadır. Bevacizumab kullanımı neticesinde yeni tümör damar oluşumunun inhibisyonu tetiklenir. Vaskülarizasyonun gerilemesi sağlanır böylece tümör büyümesi inhibe edilmektedir. Bevacizumab, birçok murin kanser modellerinde antitümör aktivite sergilemektedir [99].

ABD, FDA tarafından Şubat 2004'te, Bevacizumab, 5-florourasil bazlı kemoterapi ile kombinasyon halinde kolorektal kanser için birinci basamak tedavide kullanılmak amacıyla onaylanmıştır. Bu sebeple tümörde vaskülarizasyonu etkileyen ilk onaylanmış ajandır [96].

ABD' de bevacizumab, metastatik meme kanseri hastalarının birinci basamak tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde kullanım için onaylanmıştır [100]. Bevacizumab, anjiyo oluşumunu inhibe etmek için tasarlanmış ilk ABD Gıda ve İlaç İdaresi onaylı tedavidir. 2009 yılında bevacizumab tekrarlayan glioblastom için onaylanmıştır ve erken dönem kanserlerde kullanılmak amacıyla klinik tetkikler devam etmektedir. Daha öncesinde de çeşitli metastazların tedavisinde faydalanılmıştır [101].

Bavacizumab klinik uygulamada bir doz cevap ilişkisi henüz kesin olarak belirtilmemektedir. Kolorektal, akciğer ve birinci evre yumurtalık kanseri ile ilgili olarak gerçekleştirilen araştırmalar bevacizumab tedavisinin düşük dozda olması gerektiğini bildirirken, diğer kanser türlerinde karşılaştırmalı çalışmalar yapılmadan doz önerisi yapılamamaktadır [102].

İntravitreal bevacizumabla, genellikle altta yatan bir hastalığın sonucu olarak gelişen neovaskülarizasyon veya vasküler sızıntı ile ilişkili çok sayıda oküler bozukluğu tedavi etmek için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Tedaviye yanıt olarak neovaskülarizasyonun gerilemesini gösteren bulgular elde edilmiştir [103].

Venöz tromboembolizm, kanserli hastalarda hastalığa yakalanma ve ölüm sıklığının önde yer alan sebeplerindendir. Kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan VEGF karşı rekombinant insanlaştırılmış bir monoklonal antikor olan yeni antianjiyogenik ajan bevacizumab ile venöz tromboembolizm riskine ilişkin endişeler

ortaya çıkmıştır. Venöz trombolizm gelişiminin, bevacizumabın anti VEGF etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bevacizumab, VEGF' nin neden olduğu endotelial rejenerasyonu inhibe ederek tromboza yol açan subendotelial prokoagulan fosfolipidleri açığa çıkarabileceği buna ek olarak bevacizumabın nitrik oksit ve prostasiklin üretimini azaltıp, böylece tromboembolik olaylara yatkınlık oluşturabileceği şüpheleri mevcuttur [104]. Yan etkilerin ciddiyetine bağlı olarak, bevacizumab maruziyetinin geçici veya kalıcı olarak kesilmesi önerilmektedir [105].

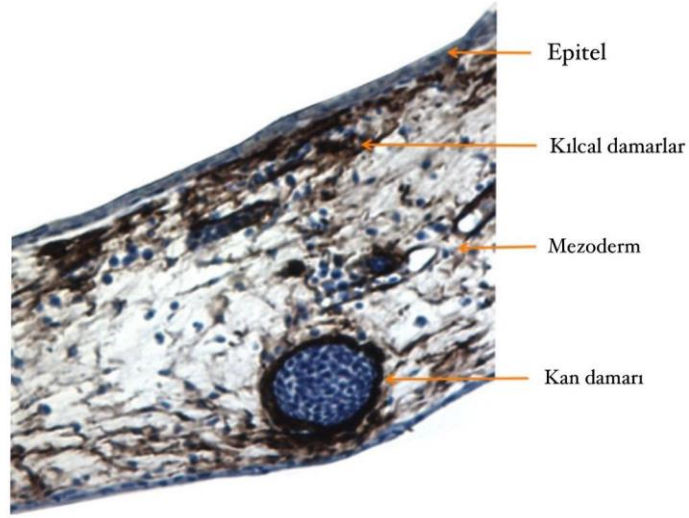
Bevacizumab ile yapılan kontrollü klinik çalışmalarda yan etkiler görülmektedir fakat bu etkilerin çoğu hafif veya orta şiddetli olup bir çoğu eş zamanlı kemoterapi ile ilişkilendirilmektedir [106]. Bevacizumab ile ilişkili perforasyon için spesifik risk faktörleri kesin olarak belirlenmemektedir [107].

1.8. Koryoallantoik Membran (CAM)

Koryoallantoik membran (CAM) modeli, 1974 yılında Folkman ve arkadaşları sayesinde bilim dünyasına girmiştir. Pek çok tümör anjiyogenez çalışmaları, tümör nakli deneyleri, anjiogenez ve anti-anjiyogenez gibi araştırmalarda kullanılmaktadır [108-110].

1.8. 1. CAM evreleri

CAM modeli çoklu numunelerde anjiyogenik faktörleri tanımlama çalışmalarında kullanılmaktadır. İlkel kan damarları kuluçkanın 3.gününde şekillenmeye başladığı zaman endoderm ve mezodermden ekstra embriyonik bir zar olan allantois türetilmektedir. Takiben 4.günde allantois koryon ile birleşir ve koryoallantoik membranı oluşturur [111].



Şekil 1. 3. Enine bir CAM bölümünde α -düz kas aktininin (koyu kahverengi) immünohistokimyasal görseli [112].

Koryon ve allantoisin kısmi füzyonu neticesinde koryoallontoik mebran (CAM) oluşmakta ve hızla gelişmektedir. CAM'daki çift katlı mezoderm tabakası kan damarları açısından oldukça zengin bir dokudur. Ayrıca embriyonik dolaşıma allantoik bir toplardamar ve allantoik iki atardamar aracılığıyla bağlanmaktadır [113].

Çok ince bir yapı olan CAM yapısal olarak kabuk zarına bağlı bulunan ektoderm, kan damarları ve stromal bileşenlerden zengin mezoderm ile allantoik boşluğa bakan endoderm olarak üç temel katmandan oluşmaktadır. İnkübasyonun 12.gününde tüm embriyoyu çevrelemektedir. Fonksiyonu dış çevre ile gaz alışverişini sağlamak, ekstra embriyonik solunum kılcal damarları için bir destek sağlamak, sodyum ve klorürü allantoik keseden ve kalsiyumu yumurta kabuğundan embriyonik damar sistemine taşımak, allantoik kesenin duvarının bir parçasını oluşturmak ve boşaltım ürünlerini toplamaktır [114, 115].

Vasküler fonksiyonları araştırmak veya manipüle etmek için tercih edilen CAM modeli, anjiyogenez testlerine ek olarak bağışıklık hücresi çalışmaları, transplantasyon ve tedaviye yanıtları araştırmak amacıyla da tercih edilmektedir. Model ilk olarak 1911 yılında, Rous ve Murphy tarafından tavuk sarkom tümörlerinin büyümesini gözlemek amacıyla kullanılmıştır. 1930'larda CAM virüs ve bakterilerin ekimi için tercih edilmiştir [112].

1.9. Anjiyogenez

Yeni kılcal kan damarlarının oluşumu olarak belirtilen anjiyogenez veya neovaskülarizasyon, fizyolojik süreçler haricinde patolojik pek çok süreç için de oldukça önemlidir. Otoimmün reaksiyonlardan inflamasyona kadar pek çok olayla ilişkili olan anjiyogenez, kan damarlarının oluşumu erken embriyonik gelişim esnasında plasenta ve ekstra embriyonik membranların oluşumunda birincil unsurdur. Anjiyogenez, embriyonik gelişim sırasında embriyonun bireysel yapısının büyüme ile alakalı gereksinimlerini sağlayarak önemli bir düzenleyici faktör olarak işlev görmektedir [116].

Damar oluşumunun artması yara iyileşmesini hızlandıracak ve vasküler yetmezlik bölgelerinde yeni kan akışını sağlayacaktır. Bununla beraber anjiyogenezin inhibisyonu sonucunda da tümörlerin gerilemesi, metastatik oluşumların azalması ve immün aracılı veya inflamasyonla ilişkili vaskülitin azalması sağlanmaktadır [116].

Judah Folkman, damar oluşumu konusuyla ilgili kapsamlı şekilde araştırmalar gerçekleştirmiştir ve tümörlerin bir kan ağı oluşturmaya kadar uyku durumunda olduğunu fakat besin ve diğer faktörleri sağlamak amacıyla damarları uyarıp sonra malign hal alıp hızla büyüdüklerini ortaya koymuştur. Göz hastalıkları açısından bakıldığında anjiyogenez, neovaskülarizasyon olarak adlandırılmaktadır. Neovaskülarizasyon, diyabetik retinopati durumunda körlüğe neden olabilir. Diş hekimliğinde diş eti iltihabı; dermatoloji uzmanlığında sedef hastalığı, egzama ve sklerodermanın önemli bir bileşenidir. Ayrıca immünologlar anjiyogenezin enflamasyondan başka bazı otoimmün hastalıkların bir aracısı olarak da nitelendirmektedir [117].

1.9. 1. Fizyolojik anjiyogenez

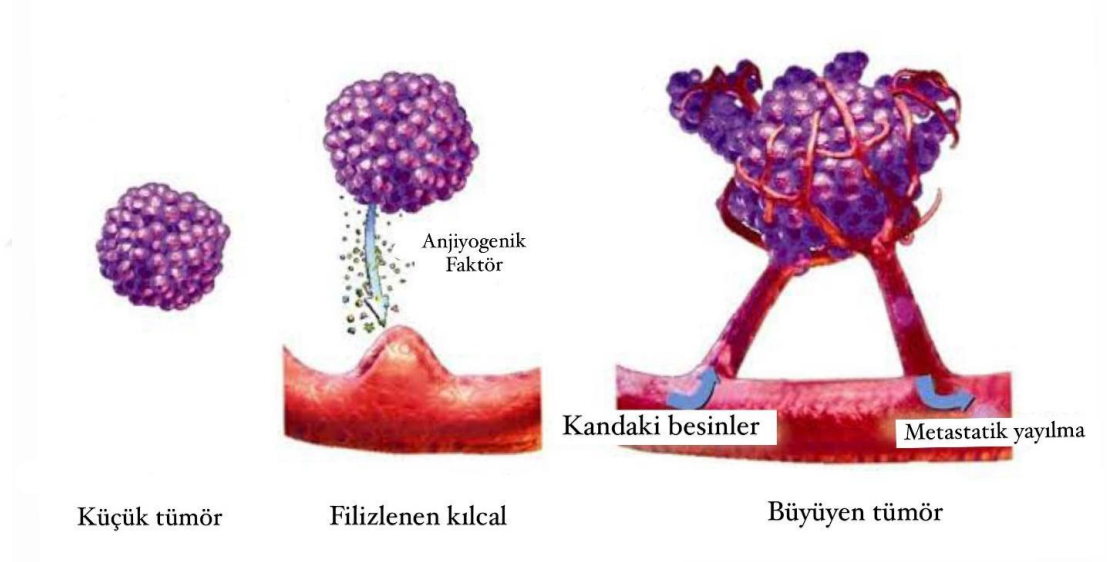
Fizyolojik anjiyogenez somit oluşumuna karşılık gelen gastrulasyon evresinin hemen devamında başlamaktadır. Anjiyogenez genel olarak, hali hazırda var olan vasküler tüplerden kan damarlarından arter ve damarların oluşum süreci şeklinde açıklanabilmektedir.

Anjiyogenez süreci, sessiz EC (Endotel Hücre) tarafından başlatılır. EC, perisitlerin kılcal damarlardan ayrılmasını destekler. Daha sonra çoğalan EC, hareketlilik kazanmak amacıyla filopodia yaparak anjiyogenik uyarana doğru göç eder. Daha sonra "uç hücreler" oluşan damarlanmalara öncüllük eder ve devamında "sap hücreleri" bir lümen oluşturup damarlanma filizlerinin uzamasını desteklemek için çoğalır. Sonucunda uç hücreleri komşu damarlanmalardan gelen hücrelerle birleşerek

bağlantı damar döngülerini (anastomoz) oluşturur. Özellikle, Tie-2 (Anjiyopoietini Bağlayan Reseptör) ve Nrp-1(Neuropilin-1)'i eksprese eden makrofajlar, damar dallanma noktalarında lokalize olur ve VEGF-C salgılayarak ve uç hücrelerde VEGFR-3 sinyali ve Dll-4 (Delta-Like Ligand 4) ekspresyonunu aktive ederek vasküler anastomozu destekler. Dll-4 daha sonra sap hücrelerde Notch sinyali aktive eder ve dağılmalarını bastırır [118].

1.9. 2. Patolojik anjiyogenez

Fizyolojik anjiyogenez ile pek çok hücre ve moleküler süreci ortak olan patolojik anjiyogenezin ayırıcı özelliği oldukça düzensiz bir vasküler ağ oluşumu göstermesidir. Patolojik anjiyogenez endotelin hareketsiz durumunun kaybı, inflamasyon, ateroskleroz çeşitli vaskülopati türleri ve kanser dahil olmak üzere çeşitli patolojik durumların ortak bir özelliğidir [118].



Şekil 1. 4. Kan damarlarının filizlenmesinin sebep olduğu tümör genişlemesi ve sonrasında küçük tümör durumundan kılcal kan damarları ile filizlenip büyüyen tümör oluşumu [112].

Tümör büyümesi ve metastazına ek olarak çeşitli oküler patolojileri inhibe etmek amacıyla anti-anjiyogenez reaktiflerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bu ve benzeri durumlarda VEGF ve FGF (Fibroblast büyüme faktörleri) gibi anjiyogenez faktörleri ayrıca iskemik hastalıklarda terapötik anjiyogenezi teşvik etmede klinik kullanıma sahiptir. Anjiyogenezi teşvik edici veya önlemeye yönelik güçlü yeni ilaçların geliştirilmesi amacıyla çok sayıda çalışma gerçekleştirilmektedir [119].

Araştırmaların sonuçlarının bazıları SB kullanımının insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin gözlenmediğini belirtirken, bazı çalışmaların sonuçlarına göre tam olarak güvenilmesinin yanlış olduğu, güvenilirliğinden kuşku duyulması gerektiği savunulmaktadır. Ek olarak herhangi bir kimyasal maddenin kullanımı sırasında, kimyasalın doz-cevap analizine göre güvenilirliğinin değerlendirilmesi gerektiği savunulmaktadır. Biz de çalışmamızda gıda katkı maddelerinden SB' nin koryoallantoik membran modeli (CAM) kullanılarak döllelenmiş tavuk yumurtalarında anti-anjiyogenik etkileri ile total antioksidan (TAS) ve total oksidan (TOS) seviyeleri üzerine etkisinin araştırılmasını amaçladık.



2. MATERYAL METOD

Çalışma, Alaaddin Keykubat Üniversitesi TIP Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında gerçekleştirildi. Elde edilen sıvı örnekleri Alaaddin Keykubat Üniversitesi TIP Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında çalışılmıştır.

2.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda 50 adet döllenmiş tavuk yumurtası kullanılmıştır. Yumurtaların kuluçka makinesinde yüzde % 60-80 nem ve 37 °C sıcaklık altında 2 saatte bir rotasyon gerçekleştirilecek ortamda gelişmeleri sağlanmıştır.

2.2. Sodyum Benzoat

Çalışmamızda SB' nin anti-anjiyogenik ve oksidatif stres üzerine etkileri incelendi. SB' nin molekül formülü $C_7H_5NaO_2$, molekül kütlesi $144,11 \text{ g/mol}^{-1}$ ve yoğunluğu $1,44 \text{ g/cm}^{-3}$ 'dür. Çalışmamız için kullanılan SB Merck Sigma' dan temin edildi. SB' nin dozları aşağıda belirtilen şekilde hazırlandı.

Tablo 2. 1. Sodyum benzoat çözelti içeriği.

Çözelti Bileşenleri	Steril dH ₂ O	Stok	SB 10 ⁻³	SB 10 ⁻⁴	SB 10 ⁻⁵	Kontrol	Total
Çözelti İçeriği	600 ml	9gr Agar	0.0072 gr SB ve 50ml stok çözelti	SB 10 ⁻³ derişimli 5 ml çözelti ve 45ml stok çözelti	SB 10 ⁻⁴ derişimli çözeltden 5 ml eklenip, son hacim stok çözelti ile 50 ml'ye tamamlanır.	50 ml stok çözelti	50 ml

2.3. Deney Gruplarının Düzenlenmesi

50 adet döllenmiş tavuk yumurtası 5 gruba, her grupta 10'ar adet döllenmiş yumurta olacak şekilde pay edildi (Tablo 2. 2).

Tablo 2. 2. Deney gruplarının düzenlenmesi.

Grup	Yumurta Sayısı (n)	İlaç Konsantrasyonları
Kontrol (Negatif Kontrol)	10	Yalnızca stok çözelti
Sodyum Benzoat	10	10^{-3} M
Sodyum Benzoat	10	10^{-4} M
Sodyum Benzoat	10	10^{-5} M
Bevacizumab (Pozitif Kontrol)	10	10^{-6} M
Toplam	50	

2.4.Deney Prosedürü

1. Kuluçkanın 1.günü %70'lik alkol hazırlandı ve döllenmiş tavuk yumurtaları temizlendi. Sonrasında yumurtalar kuluçka makinesine, kuluçka makinesinde sıcaklık 37 ° C, nem 60-80 olacak şekilde ayarlanıp yumurtalar her 2 saatte bir dönecek şekilde yerleştirildi (Şekil. 2.1).



Şekil 2.1: Kuluçka makinesi.

2. Kuluçkanın 3. günü yumurtaların hepsinin alt kısmından enjektör yardımıyla 4-5 cc olacak şekilde sıvı alındı ve delinmiş noktalar flaster bant yardımıyla kapatıldı (Şekil 2. 2).



Şekil 2.2 : Enjektör yardımıyla döllenmiş tavuk yumurtasından sıvı alınması.

3. 10 adet yumurta, kontrol grubu olarak seçildi ve yumurtalara kontrol gurubu şeklinde not edildi. Kontrol grubundan alınan sıvı ependorf tüplere porsiyon edilip -80°C ' de dondurucuda muhafaza edildi.
4. Kuluçkanın 5. gününde distile su içerisinde agar ısıt işlem yardımıyla çözdürülerek stok solüsyon hazırlandı. 0.0072 gram SB tartıldı, üzerine stok solüsyon son hacim 50 ml olana kadar ilave edildi. Bu durumda 10^{-3} M konsantrasyonunda çözelti hazırlanmış oldu.



Şekil 2. 3. Çözelti hazırlanma aşaması.

5. İki adet cam brüt içerisine 45'er ml olacak şekilde stok çözeltiden eklendi. Sonra sırasıyla ikinci içerisinde 45 ml stok solüsyon bulunan mezürün içerisinde son hacim 50 ml'ye tamamlanacak şekilde 10^{-3} M konsantrasyonundaki birinci çözeltiden eklendi. Sonuç olarak bu ikinci çözelti 10^{-4} M konsantrasyonunda ayarlanmış oldu.
6. Üçüncü cam brüt içerisine de 10^{-4} M konsantrasyonundaki çözeltiden eklenilerek son hacim 50 ml'ye tamamlandı ve nihayetinde 10^{-5} M konsantrasyonunda üçüncü çözelti hazırlanmış oldu.
7. Kontrol grubu için içerisinde SB içermeyen, sadece stok solüsyon ile pellet oluşturuldu.
8. Pozitif kontrol grubu 10^{-6} M konsantrasyonda bevacizumab içerecek şekilde hazırlandı.
 - 8.1 0.00745 gr bevacizumab hassas terazide tartıldı. 10^{-6} konsantrasyonunda hazırlanmak üzere cam brüt içerisine yerleştirildi ve son hacim 50 ml olacak şekilde stok solüsyon ile tamamlandı.

9. Dölllenmiş tavuk yumurtaları pencereleme yöntemi ile daha önce delik açılmış olan kısmın aksi yönünden açıldı ve içerlerine sırasıyla 10^{-3} M SB, 10^{-4} M SB, 10^{-5} M SB konsantrasyonlarda hazırlanan SB içeren pelletler yerleştirildi. Kontrol grubu yumurtalarına ise boş pelletler (SB içermeyen, yalnızca stok çözelti bulunan pelletler) yerleştirildi. Pozitif kontrol grubu olarak hazırlanmış olan 10^{-6} M konsantrasyondaki bevacizumab pelletleri de yerleştirildikten sonra yumurtaların üzeri streç film ile kapatıldı ve kuluçka makinasına yerleştirildi. (Şekil 2. 4)



Şekil 2. 4. Model içerisine yerleştirilmiş pelletin lokasyonu.

10. Kuluçkanın 6. ve 7. gününde embriyolarda anjiyogenez incelenip fotoğraflandı.
11. Kuluçkanın 8. günü embriyolar son kez incelenerek, fotoğraflanıp mikro pipet yardımıyla tüm yumurtalardan sıvılar ependorf içerisine porsiyonlandı.

2.5. Biyokimyasal Ölçümler

8 günün sonunda sakrifiye edilen embriyoların sıvıları tüplere konulmuştur. Tayin gününe kadar -80°C dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Sıvıların TAS ve TOS analizi için Rel Assay markasına ait kitler tercih edilmiştir. Analizler firmanın belirttiği metoda göre gerçekleştirilmiştir.

TAS ölçümü, sıvı örneğinin ortama eklenmesi ve eklenen örnekteki antioksidan etkisiyle ABTS radikalinin (3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) renk değişimi ile sonuçlanan otomatik ölçüm metodu ile sağlandı.

TOS değerleri otomatik ölçüm metodu ile elde edildi.

OSİ (Oksidatif stres indeksi), TOS ölçümlerinin TAS ölçümlerine oranı olacak şekilde hesap edildi. Sonuçlar “arbitrary unit” (AU) şeklinde belirtildi.

$$OSI = TOS/TAS$$

2.6. Anti-anjiyogenez Skorlama

Anti-anjiyogenez daha önceki çalışmalarda belirtilen skorlama prensibine göre gerçekleştirildi (Tablo 2. 3.).

Tablo 2. 3. Koryoallantoik membrandaki anti-anjiyogenik etkileri araştırmak için kullanılan skor değerleri.

Skor	Etki	Gözlem/Açıklama
0	Yok	Normal embriyo gelişimi. Çevredeki kılcal damarlarda herhangi değişiklik yok.
0,5	Zayıf	Kılcal damarsız alan yoktur. Pelletten daha küçük azalmış kılcal damar yoğunluğu
1	Orta	Spesifik alanda azalmış kılcal damar yoğunluğu ya da küçük kılcal damarsız alan. Etkiler pellet boyutunun iki katından daha az.
2	Güçlü	Pelletin çevresinde pellet boyutunun iki katından daha fazla kılcal damarsız alan.

Embriyolardaki anti-anjiyogenezin değerlendirmesinde yapılan skorlama ile elde edilen veriler ile ortalama skor değerlerine ulaşılmıştır ve anti-anjiyogenik etkiler bu ortalama skora göre değerlendirilmiştir. Bu skorlama sistemine göre; 0,5’ten küçük skorlar anti-anjiyogenik etki olmadığını göstermektedir, 0,5-1 arası skor zayıf, 1’den büyük skorlar güçlü anti-anjiyogenik etki olduğunu göstermektedir. Ortalama skor değerleri aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

Ortalama skor değeri= [(Yumurta Sayısı (skor 1) x 1) + (Yumurta Sayısı (skor 2) x 2)] / Toplam Yumurta Sayısı şeklindedir.

2.7. İstatiksel Yöntemler

Araştırma verileri istatistiksel olarak normallik analizi istatistik kullanılarak kontrol edildi. Grup karşılaştırmalarında SB’ nin, araştırılan değişken seviyelerinin gruplar arasında eğer mevcut ise farklılığı ifade etmek, gruplar arasında ikili karşılaştırmalar için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve çoklu karşılaştırma analiz

testi kullanıldı. Çalışmanın bütün testlerinde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi. Tüm analizlerden elde edilen ham değerler, grupların ortalaması $\pm$ standart hata şeklinde sunuldu.



3.BULGULAR

3.1. İstatistik Analiz Bulguları

Biyokimyasal belirteçlerin sonuçları, tek yönlü ANOVA testi kullanılarak değerlendirildi.

Tablo 3.1. Biyokimyasal analiz sonuçları (Descriptives).

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Sig. (p)
TAC	Pre-ProcessControl	10,00	0,91	0,07	0,02	0,86	
	Post-ProcessControlsham	10,00	0,71	0,10	0,03	0,64	
	10 ⁻³ SB	10,00	0,64	0,14	0,04	0,55	0,00
	10 ⁻⁴ SB	10,00	0,62	0,11	0,03	0,55	
	10 ⁻⁵ SB	10,00	0,85	0,15	0,05	0,75	
	Bevacizumab	10,00	1,29	0,76	0,24	0,75	
	Total	60,00	0,84	0,39	0,05	0,74	
TOC	Pre-ProcessControl	10,00	2,38	0,42	0,13	2,08	
	Post-ProcessControlsham	10,00	4,50	0,71	0,22	3,99	
	10 ⁻³ SB	10,00	10,64	1,19	0,38	9,79	0,00
	10 ⁻⁴ SB	10,00	7,09	0,83	0,26	6,49	
	10 ⁻⁵ SB	10,00	6,47	1,63	0,51	5,31	
	Bevacizumab	10,00	11,23	2,12	0,67	9,72	
	Total	60,00	7,05	3,39	0,44	6,18	
OSI	Pre-ProcessControl	10,00	2,67	0,71	0,23	2,15	
	Post-ProcessControlsham	10,00	6,42	1,26	0,40	5,52	
	10 ⁻³ SB	10,00	17,05	2,97	0,94	14,93	0,00
	10 ⁻⁴ SB	10,00	11,57	1,61	0,51	10,42	
	10 ⁻⁵ SB	10,00	7,63	1,41	0,45	6,62	
	Bevacizumab	10,00	12,27	7,29	2,31	7,06	
	Total	60,00	9,60	5,68	0,73	8,13	

Her bir grubumuzun TAS, TOS ve OSI için ortalama, standart sapma ve standart hata değerlerimiz Tablo 3.1.'de yer almaktadır.

Tablo 3.2. (Post Hoc Tests) Deney Sonrası Çoklu Karşılaştırmalar (TAC).

Multiple Comparisons								
Dependent Variable				Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
TAC	Bonferroni	Pre-ProcessControl	Post-ProcessControlsham	0,20	0,15	1,00	-0,25	0,65
			10 ⁻³ SB	0,27	0,15	1,00	-0,18	0,71
			10 ⁻⁴ SB	0,29	0,15	0,83	-0,16	0,74
			10 ⁻⁵ SB	0,06	0,15	1,00	-0,39	0,51
			Bevacizumab	-0,38	0,15	0,18	-0,83	0,07
		Post-ProcessControlsham	Pre-ProcessControl	-0,20	0,15	1,00	-0,65	0,25
			10 ⁻³ SB	0,07	0,15	1,00	-0,38	0,52
			10 ⁻⁴ SB	0,09	0,15	1,00	-0,36	0,54
			10 ⁻⁵ SB	-0,14	0,15	1,00	-0,59	0,31
			Bevacizumab	-,57798*	0,15	0,00	-1,03	-0,13
		10 ⁻³ SB	Pre-ProcessControl	-0,27	0,15	1,00	-0,71	0,18
			Post-ProcessControlsham	-0,07	0,15	1,00	-0,52	0,38
			10 ⁻⁴ SB	0,02	0,15	1,00	-0,43	0,47
			10 ⁻⁵ SB	-0,21	0,15	1,00	-0,66	0,24
			Bevacizumab	-,64556*	0,15	0,00	-1,09	-0,20
		10 ⁻⁴ SB	Pre-ProcessControl	-0,29	0,15	0,83	-0,74	0,16
			Post-ProcessControlsham	-0,09	0,15	1,00	-0,54	0,36
			10 ⁻³ SB	-0,02	0,15	1,00	-0,47	0,43
			10 ⁻⁵ SB	-0,23	0,15	1,00	-0,68	0,22
			Bevacizumab	-,66638*	0,15	0,00	-1,12	-0,22
		10 ⁻⁵ SB	Pre-ProcessControl	-0,06	0,15	1,00	-0,51	0,39
			Post-ProcessControlsham	0,14	0,15	1,00	-0,31	0,59
			10 ⁻³ SB	0,21	0,15	1,00	-0,24	0,66

		10 ⁻⁴ SB	0,23	0,15	1,00	-0,22	0,68
		Bevacizumab	-0,44	0,15	0,06	-0,89	0,01
	Bevacizumab	Pre-ProcessControl	0,38	0,15	0,18	-0,07	0,83
		Post-ProcessControlsham	,57798*	0,15	0,00	0,13	1,03
		10 ⁻³ SB	,64556*	0,15	0,00	0,20	1,09
		10 ⁻⁴ SB	,66638*	0,15	0,00	0,22	1,12
		10 ⁻⁵ SB	0,44	0,15	0,06	-0,01	0,89

*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır. Bonferroni çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakılarak genel olarak hemen hemen tüm gruplar TAS değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir (p<0.05).

Tablo 3. 3. Post Hoc Tests (Deney Sonrası) Çoklu Karşılaştırmalar (TOC).

Multiple Comparisons							
Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
TOS	Bonferroni	Pre-ProcessControl Post-ProcessControlsham	0,20	0,15	1,00	-0,25	0,65
		10 ⁻³ SB	0,27	0,15	1,00	-0,18	0,71
		10 ⁻⁴ SB	0,29	0,15	0,83	-0,16	0,74
		10 ⁻⁵ SB	0,06	0,15	1,00	-0,39	0,51
		Bevacizumab	-0,38	0,15	0,18	-0,83	0,07
		Post-ProcessControlsham Pre-ProcessControl	-0,20	0,15	1,00	-0,65	0,25
		10 ⁻³ SB	0,07	0,15	1,00	-0,38	0,52
		10 ⁻⁴ SB	0,09	0,15	1,00	-0,36	0,54
		10 ⁻⁵ SB	-0,14	0,15	1,00	-0,59	0,31
		Bevacizumab	-,57798*	0,15	0,00	-1,03	-0,13
		10 ⁻³ SB Pre-ProcessControl	-0,27	0,15	1,00	-0,71	0,18

		Post-ProcessControlsham	-0,07	0,15	1,00	-0,52	0,38
		10 ⁻⁴ SB	0,02	0,15	1,00	-0,43	0,47
		10 ⁻⁵ SB	-0,21	0,15	1,00	-0,66	0,24
		Bevacizumab	-,64556*	0,15	0,00	-1,09	-0,20
10 ⁻⁴ SB		Pre-ProcessControl	-0,29	0,15	0,83	-0,74	0,16
		Post-ProcessControlsham	-0,09	0,15	1,00	-0,54	0,36
		10 ⁻³ SB	-0,02	0,15	1,00	-0,47	0,43
		10 ⁻⁵ SB	-0,23	0,15	1,00	-0,68	0,22
		Bevacizumab	-,66638*	0,15	0,00	-1,12	-0,22
10 ⁻⁵ SB		Pre-ProcessControl	-0,06	0,15	1,00	-0,51	0,39
		Post-ProcessControlsham	0,14	0,15	1,00	-0,31	0,59
		10 ⁻³ SB	0,21	0,15	1,00	-0,24	0,66
		10 ⁻⁴ SB	0,23	0,15	1,00	-0,22	0,68
		Bevacizumab	-0,44	0,15	0,06	-0,89	0,01
Bevacizumab		Pre-ProcessControl	0,38	0,15	0,18	-0,07	0,83
		Post-ProcessControlsham	,57798*	0,15	0,00	0,13	1,03
		10 ⁻³ SB	,64556*	0,15	0,00	0,20	1,09
		10 ⁻⁴ SB	,66638*	0,15	0,00	0,22	1,12
		10 ⁻⁵ SB	0,44	0,15	0,06	-0,01	0,89

*. Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır. Bonferroni çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakılarak tüm grupların TOS değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir (p<0.05).

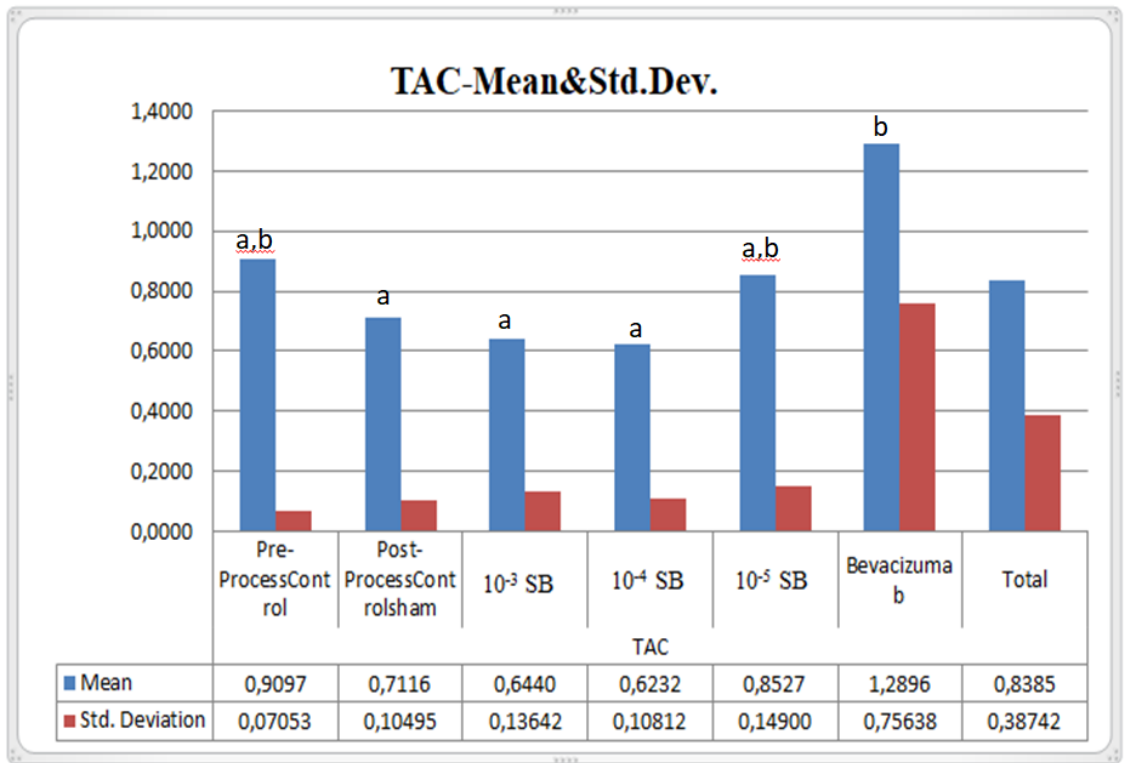
Tablo 3. 4. Post Hoc Tests (Deney Sonrası) Çoklu Karşılaştırmalar (OSI).

Multiple Comparisons								
Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
						Lower Bound	Upper Bound	
ISO	Bonferroni	Pre-ProcessControl	Post-ProcessControlsham	-3,75	1,51	0,24	-8,40	0,89
			10 ⁻³ SB	-14,38400*	1,51	0,00	-19,03	-9,74
			10 ⁻⁴ SB	-8,90400*	1,51	0,00	-13,55	-4,26
			10 ⁻⁵ SB	-4,96300*	1,51	0,03	-9,61	-0,32
			Bevacizumab	-9,60678*	1,51	0,00	-14,25	-4,96
		Post-ProcessControlsham	Pre-ProcessControl	3,75	1,51	0,24	-0,89	8,40
			10 ⁻³ SB	-10,63100*	1,51	0,00	-15,28	-5,99
			10 ⁻⁴ SB	-5,15100*	1,51	0,02	-9,80	-0,51
			10 ⁻⁵ SB	-1,21	1,51	1,00	-5,86	3,44
			Bevacizumab	-5,85378*	1,51	0,00	-10,50	-1,21
		10 ⁻³ SB	Pre-ProcessControl	14,38400*	1,51	0,00	9,74	19,03
			Post-ProcessControlsham	10,63100*	1,51	0,00	5,99	15,28
			10 ⁻⁴ SB	5,48000*	1,51	0,01	0,83	10,13
			10 ⁻⁵ SB	9,42100*	1,51	0,00	4,78	14,07
			Bevacizumab	4,77722*	1,51	0,04	0,13	9,42
		10 ⁻⁴ SB	Pre-ProcessControl	8,90400*	1,51	0,00	4,26	13,55
			Post-ProcessControlsham	5,15100*	1,51	0,02	0,51	9,80
			10 ⁻³ SB	-5,48000*	1,51	0,01	-10,13	-0,83
			10 ⁻⁵ SB	3,94	1,51	0,18	-0,70	8,59
			Bevacizumab	-0,70	1,51	1,00	-5,35	3,94
		10 ⁻⁵ SB	Pre-ProcessControl	4,96300*	1,51	0,03	0,32	9,61

	Post-ProcessControlsham	1,21	1,51	1,00	-3,44	5,86
	10 ⁻³ SB	-9,42100*	1,51	0,00	-14,07	-4,78
	10 ⁻⁴ SB	-3,94	1,51	0,18	-8,59	0,70
	Bevacizumab	-4,64	1,51	0,05	-9,29	0,00
Bevacizumab	Pre-ProcessControl	9,60678*	1,51	0,00	4,96	14,25
	Post-ProcessControlsham	5,85378*	1,51	0,00	1,21	10,50
	10 ⁻³ SB	-4,77722*	1,51	0,04	-9,42	-0,13
	10 ⁻⁴ SB	0,70	1,51	1,00	-3,94	5,35
	10 ⁻⁵ SB	4,64	1,51	0,05	0,00	9,29

*, Ortalama fark 0,05 düzeyinde anlamlıdır. Bonferroni çoklu karşılaştırma sonuçlarına bakılarak tüm gruplar OSI değerleri arasında anlamlı bir farklılık görülmektedir. (p<0.05)

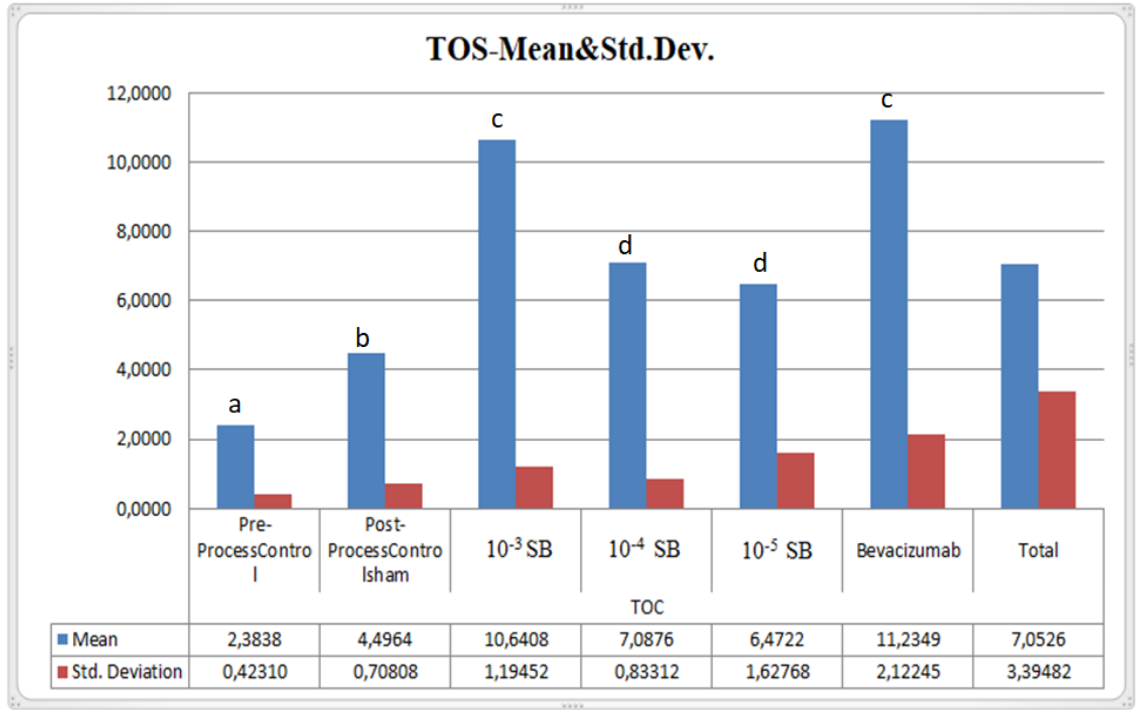
3.2. İstatistiksel Grafikler



Şekil 3. 1. Gruplara ait TAS ortalama ve standart sapma değerleri grafiği. Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

TAS ortalama değerleri prekontrol gruplarına göre postkontrol, 10^{-3} SB ve 10^{-4} SB grupları arasında anlamlı farklılık vardır. Ayrıca 10^{-5} SB grupları ile 10^{-3} SB ve 10^{-4} SB grupları arasında anlamlı farklılık vardır. TAS SD değerleri post ve prekontrol gruplarına göre 10^{-3} SB ve 10^{-5} SB gruplarında gruplarında artış göstermektedir. Pozitif kontrol grubumuz olan bevacizumabın istatistiksel açıdan TAS seviyesinde prekontrol ve 10^{-5} M SB gruplarına göre anlamlı değişim yokken diğerleri anlamlı artış gözlenmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlardaki SB tüketimi ile deney grupları arasında TAS seviyesinin düştüğü, buna bağlı olarak OSI'nin yükseldiği gözlenmiştir. Kontrol ile kıyaslandığında 10^{-4} SB en düşük TAS değerine sahipken, en yüksek TAS değeri 10^{-5} SB grubunda gözlenmiştir. (0,000; $p < 0,05$) (SD: Standart Sapma) .

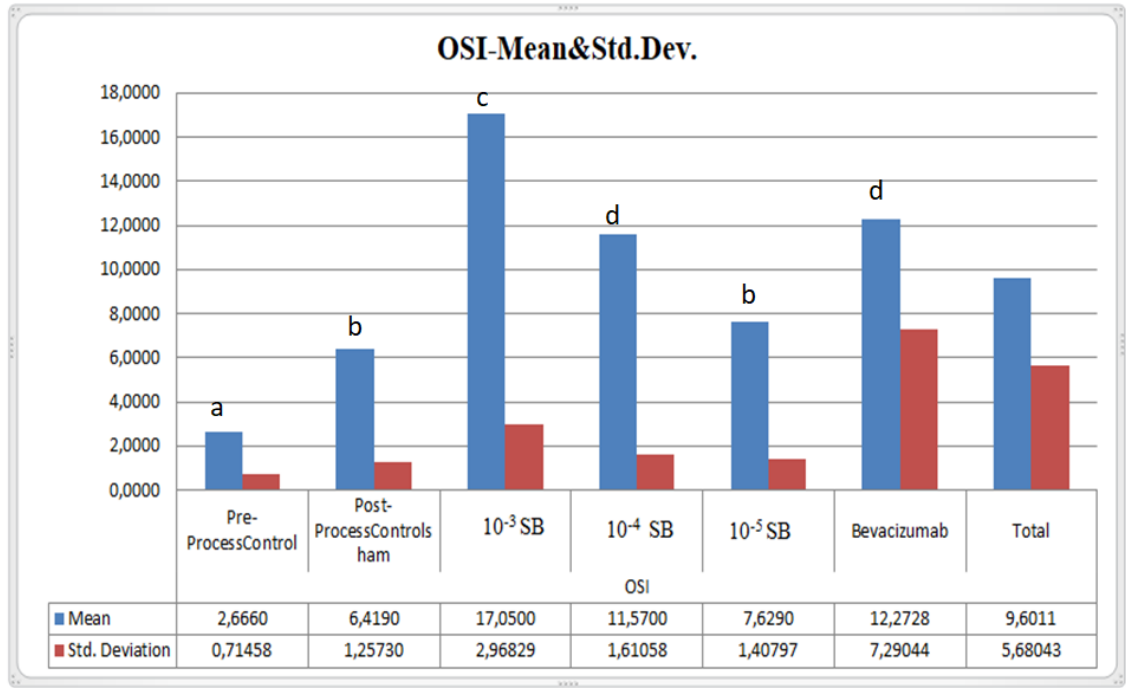


şekil 3.2. Gruplara ait TOS ortalama ve standart sapma değerleri grafiği. Stnlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

TOS ortalama değerleri prekontrol gruplarına göre postkontrol, 10^{-3} SB, 10^{-4} SB ve 10^{-5} SB gruplarında artış göstermekle birlikte en fazla artış 10^{-3} SB grubunda gözlenmektedir. TOC SD değerleri post ve prekontrol gruplarına göre 10^{-3} SB ve 10^{-5} SB gruplarında gruplarında artış göstermektedir (0.000; $p < 0,05$) (SD: Standart

Sapma). Bevacizumab uygulanan grubun TOS seviyesinde 10^{-3} M SB grubuna göre anlamlı değişim yokken diğer gruplara göre anlamlı artış gözlenmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlardaki SB tüketimi ile deney grupları arasında TOS seviyesinin yükseldiği, 10^{-3} SB en yüksek TOS değerine sahipken, en düşük TOS değeri 10^{-5} SB grubunda gözlenmiştir.



Şekil 3.3. Gruplara ait OSI ortalama ve standart sapma değerleri grafiği. Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

OSI ortalama değerlerine göre postkontrol ile pre kontrol; 10^{-4} ile prekontrol ,postkontrol ve 10^{-5} gruplarında anlamlı bir fark vardır. OSI ortalama değerleri prekontrol gruplarına göre postkontrol, 10^{-3} SB, 10^{-4} SB ve 10^{-5} SB gruplarında artış gözlemlenmektedir. OSI'in en fazla 10^{-3} SB grubunda olduğu (17.05), 10^{-3} SB grubunun ortalamasının 10^{-4} SB grubunun ortalamasından fazla olduğu, ve 10^{-3} SB grubunun ortalamasının 10^{-5} SB grubunun ortalamasının (7,629) 2 katından fazla olduğu gözlemlenmektedir. OSI SD değerleri prekontrol grubuna göre postkontrol, 10^{-3} SB, 10^{-4} SB ve 10^{-5} SB gruplarında artış göstermektedir. En fazla artış 10^{-3} SB grubunda gözlenmektedir. 10^{-4} M SB grubuna göre bevacizumab grubunda anlamlı değişim yokken, diğerlerine göre anlamlı artış gözlenmektedir.

Elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlardaki SB tüketimi ile deney grupları arasında TAS seviyesinin düşmesine bağlı olarak OSI'nin yükseldiği gözlenmiştir. 10^{-3} grubu en yüksek OSI değerine sahiptir.

Değişken doz konsantrasyonlarında SB'nin oksidan-antioksidan parametreler üzerindeki etkisi yukarıdaki verilerimizde gösterilmiştir. SB'nin antioksidan parametrelerde azalma ve oksidan parametrelerde doza bağlı olarak artışa neden olduğu gözlemlendi. En düşük konsantrasyona sahip olan 10^{-3} SB grubunda oksidan değerlerin en yüksek değerde olması ve deney gruplarından en düşük konsantrasyona sahip olan 10^{-5} SB grubunda oksidan değerlerin daha düşük gözlenmesine bağlı olarak; SB'nin oksidatif stresin artmasına neden olduğu ve ortalama oksidan değerlerin doza bağlı biçimde doğru orantılı olarak artış gösterdiği belirlendi.

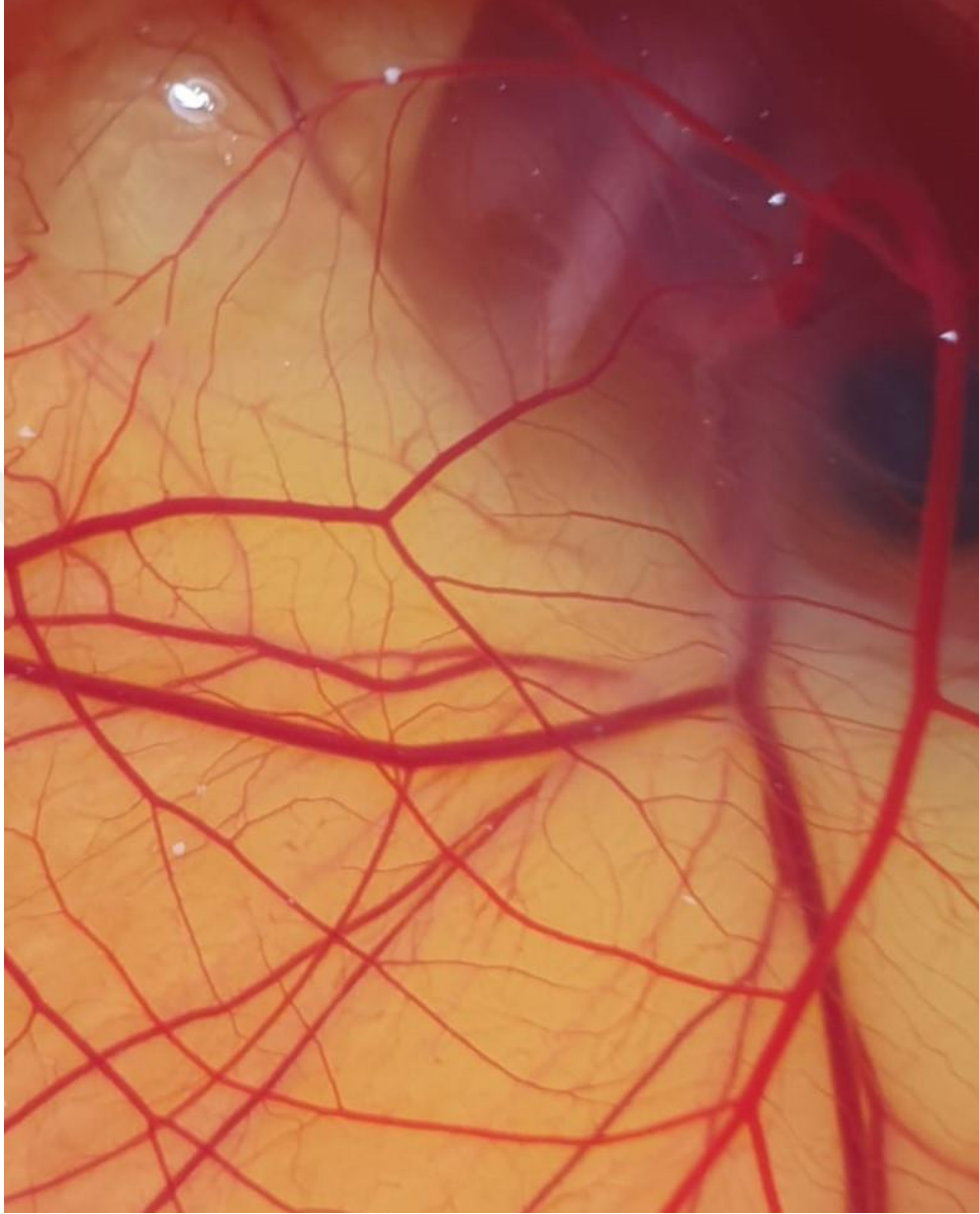
İstatistiksel sonuçlar kuluçkanın 5. ve 8. günleri aralığında 3 gün süreyle SB'ye maruz kalan embriyoların ortalama oksidan – antioksidan parametreleri kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, artan madde derişimine bağlı olarak antioksidan değerlerde azalış, oksidan değerlerinde artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

3.3. Anjiogenezin Değerlendirilmesi

Ortalama skor değerlerine (Tablo 3. 5) göre yapılan inceleme sonucunda bevacizumabın kuvvetli anti-anjiogenik etki gösterdiği (Şekil 4. 1), 10^{-3} M SB'nin orta anti-anjiogenik etkiye sebep olduğu (Şekil 4. 2) ve 10^{-4} M SB'nin (Şekil 4. 3) orta anti-anjiogenik etkiye sebep olduğu ve 10^{-5} M SB'nin (Şekil 4.4) zayıf anti-anjiogenik etkiye sebep olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 3. 5. Anti-anjiyogenik skor.

Skor	0	0,5	1	2	Ortalama Skor
Grup	Yumurta Sayıları				
Kontrol n:10	10	0	0	0	0
Sodyum Benzoat 10^{-3} M n:10	3	2	4	1	0,6
Sodyum Benzoat 10^{-4} M n:10	4	3	2	1	0,4
Sodyum Benzoat 10^{-5} M n:10	5	4	1	0	0,1
Bevacizumab 10^{-6} M n:10	0	2	4	4	1,2



Şekil 4. 1. Bevacizumab uygulanan modelde kuvvetli anti-anjiyogenez etki (Ortalama Skor:1,2).



Şekil 4. 2. SB 10^{-3} grubunda orta şiddette anti-anjiyogenez etki (Ortalama Skor:0,6).



Şekil 4. 3. SB 10^{-4} grubunda orta şiddette anti-anjiyogenez etki (Ortalama Skor:0,4).



Şekil 4. 4. SB 10^{-5} grubundaki zayıf anti-anjiyogenez etki (Ortalama Skor:0,1).

4.TARTIŞMA

İnsanların tükettikleri besinlerin çok büyük miktarı doğal olarak meydana gelmekle birlikte bu besinlere bilerek ilave edilen binlerce kimyasal madde bulunmaktadır. Bu ilave maddelere gıda katkı maddesi adı verilmektedir. Gıda katkı maddeleri , gıdalara lezzet vermek, renklendirmek amacıyla kullanılabileceği gibi gıda işleme aşamasında koruyuculuk veya kıvam oluşturmak için fiziksel ve kimyasal etkileri elde etmek amacıyla da tercih edilebilmektedir [120]. Günümüzde paketli gıda kullanımı günden güne artmaktadır. Bu artışla birlikte insanların maruz kaldığı gıda katkı maddelerinde de artış olmaktadır. Biz de çalışmamızda, sık kullanılan gıda katkı maddelerinden SB'nin CAM modelinde anti-anjiyogenez ve oksidatif stres üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

CAM modeli anjiyogenez ve anti-anjiyogenezin incelenmesi için sıklıkla kullanılmakla birlikte her yöntemde olduğu gibi çeşitli dezavantajları da bulunmaktadır. Bunlar spesifik olmayan inflamasyonlar, modelin hassasiyeti, oluşan yeni damarlar ile eski damarların ayırt edilmesinde zorluk ve damarların yeniden düzenlenmesi ile yeni damar oluşumu ayırt edilmesidir [121]. Bu gibi dezavantajların yanı sıra CAM modelinin tercih edilmesine sebep olacak çok sayıda avantajı bulunmaktadır. Bu avantajlardan başlıcaları CAM modelinde memeli modellerine göre çok hızlı bir şekilde sonuç alınması [114], anneden hiçbir metabolik veya hormonal etkiye ihtiyaç duyulmayan vasküler sisteme doğrudan erişilebilmesi, makroskobik olarak çalışma sonuçlarının gözlenebilmesi, ışık veya elektron mikroskopu gibi farklı duyarlılıklarda histokimyasal araştırmalar gerçekleştirilebilmesi, fikse edilemeyen örnekler için gen ekspresyonunun belirlenmesinin amaçlandığı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) çalışmaları için elverişli olması, büyüme faktörleri gibi uygulamaların herhangi etkiye uğramadan doğrudan etkisinin incelenebilmesi [122, 123], maliyetinin düşük olması, erişiminin kolay olması, gelişimsel süreçleri takip etmede kolaylık sağlaması ve uygulama basitliği sayılabilir [108-110]. Ayrıca CAM modelinde etik kurul onayı ihtiyacı da bulunmamakla birlikte, embriyo ve zar yapısı bozulmadan muhafaza edildiğinden bütün bir hayvan deneyine en yakın modeldir. CAM modeli sağladığı, sayılan çok sayıda avantaj sebebi ile in vivo anjiyogenez modeli olarak günümüzde en çok tercih edilen yöntemlerden birisi olarak çok sayıda çalışmada kullanılmıştır ve halen de kullanılmaya devam etmektedir [123].

Zebra balığı embriyolarında yapılan çalışma ile SB'nin embriyonik dönemde gelişimsel anomalilere sebep olduğu, ayrıca SB'nin doza bağlı olarak zebra balığı embriyolarının yumurtadan çıkışlarının azaldığı gösterilmiştir. [124]. Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada SB'nin semen kalitesinin bozulmasına, iltihaplanmaya, p53 ekspresyonunda artışa ve apoptozun indüklenmesine sebep olduğu belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada düşük doz SB'nin da uzun süre uygulama ile testislerde apoptoz ve hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir [125]. SB'nin böbrekte yüksek dozlarda üre ve kreatinin seviyelerinde artışa sebep olduğu gösterilmiş olup, üre ve kreatin artışı böbrek hasarının gösterilmesinde biyobelirteç olduğu düşünülünce böbrek hasarına sebebiyet verdiği belirtilmiştir [126]. Çalışmamızda bu verilerle uyumlu olarak SB'nin yüksek dozlarda doza bağlı olarak anti-anjiyogenik etkiye sebep olduğu tespit edildi.

Rutin metabolik işlemler sırasında sürekli olarak oksidatif ürünler oluşmaktadır ve bunlar da antioksidanlar tarafından dengelenmektedir. Eğer bu denge sağlanamaz ise oksidatif stres oluşmaktadır. Artmış oksidatif strese bağlı olarak lipid peroksidasyonu, protein karboksilasyonu, DNA hasarı ve sonunda da hücre ölümüne yol açacak hasarlar ortaya çıkabilmektedir[77]. Bu hasarın miktarı doku ve organlarda yapısal ve fonksiyonel değişikliklere sebep olabilmektedir. SB'nin farklı deneysel modellerde sıçan, zebra balığı ve farklı organlarda embriyoda, testiste, böbrekte, karaciğerde oksidatif strese sebep olarak hasara yol açtığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [64]. SB'nin metabolik ürünlerinden kaynaklanabilen serbest radikaller oluşabilmektedir [126]. Tavuk embriyoları kullanılarak gerçekleştirilen bir başka araştırmada embriyonik gelişim döneminde uygulanan SB'nin, 2. ve 5. gün maruziyeti sonrasında embriyo içeriğine ne kadar geçtiği net olarak bilinmemekle birlikte; embriyonun karaciğerinde büyüme geriliğine, ven yapısında bozulma ve histolojik değişikliklere yol açmasıyla embriyonik toksisiteye neden olma riskinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Maruziyet sonrası embriyoların özellikle vitellin damarlarında belirgin olarak gözlenen azalma makroskopik olarak da tespit edilip, zararlı etkilerin organogenez üzerinde de olumsuz sonuçlara sebebiyet vereceği anlaşılmıştır [80, 94]. Araştırmamız sonucunda, belirtilen çalışmalarla uyumlu olarak SB'nin CAM modelinde oksidatif stresi doza bağlı olarak artırdığı tespit edilmiştir. Bu çalışma CAM modelinde oksidatif stresin değerlendirildiği literatürdeki kısıtlı çalışmalardan birisidir ve bu yönüyle literatüre önemli katkı yapmaktadır.

VEGF anjiyogenezi indükleyerek yeni damar oluşumunun düzenlenmesinde merkezi öneme sahip bir moleküldür [127]. Düzensiz olarak gerçekleşen VEGF

ekspresyonu, tümör anjiyogenezi tetikleyerek tümör oluşumu ve gelişiminde rol almaktadır. Buna bağlı olarak birçok kanser çeşidinin tedavisinde VEGF inhibisyonu tedavide görev yapmaktadır [127]. Çin hamsterından elde edilip, humanize edilmiş bir monoklonal antikor olan bevacizumab, VEGF-A izoformlarına bağlanarak etkilerini ortaya çıkarmaktadır [99]. Bevacizumab, kanser tedavisi için kullanılan ve onaylanan ilk VEGF inhibitörü ajandır [128]. Bevacizumabın CAM modelinde anti-anjiyogenik etkilere sebep olduğu gösterilmiştir. [129]. Çalışmamızda da bu verilerle uyumlu olarak SB'nin kuvvetli anti-anjiyogenik etkiye sebep olduğu bulundu.

Sonuç olarak SB'nin embriyo gelişimi sürecinde oksidatif strese ve anti-anjiyogenik etkilere sebep olduğu tespit edildi. Hazır gıdaların çok miktarda SB içerdiği göz önünde tutularak gebelerin tükettiği hazır gıdalardaki SB oranları düşürülmelidir. Embriyo gelişiminin SB kullanımından etkilendiği akılda tutularak gebelikte SB kullanımı kontrol altına alınarak uzun süreli ve yüksek dozlarda kullanımın önüne geçilmelidir.

5. KAYNAKLAR

1. Pekcan, G., Beslenme durumunun saptanması. Diyet El Kitabı, 2008: p. 67-141.
2. Clemens, R. and D. Schmidt, Conflicts of interest in approvals of food additives. JAMA internal medicine, 2014. 174(2): p. 299-300.
3. Bilici, S., ve ark., Besin güvenliği. TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Beslenme Ve Fiziksel Aktiviteler Daire Başkanlığı Beslenme Bilgi Serisi, Ankara, 2006.
4. Kaya-Cebioğlu, İ. and A. Önal, Gıda katkı maddesi içeren bazı besinlerin tüketiminin ve sağlığa etkilerinin araştırılması: gıdaların risk analizi. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 3, 21-35, 2017.
5. Carocho, M., P. Morales, and I.C. Ferreira, Natural food additives: Quo vadis? Trends in Food Science & Technology, 2015. 45(2): p. 284-295.
6. Boutillier, S., S. Fourmentin, and B. Laperche, Food additives and the future of health: An analysis of the ongoing controversy on titanium dioxide. Futures, 2020. 122: p. 102598.
7. Randhawa, S. and S.L. Bahna, Hypersensitivity reactions to food additives. Current opinion in allergy and clinical immunology, 2009. 9(3): p. 278-283.
8. Rangan, C. and D.G. Barceloux, Food additives and sensitivities. Disease-a-month, 2009. 55(5): p. 292-311.
9. Zugravu, C.A., ve ark., Attitudes towards food additives: A pilot study. The Annals of the University Dunarea de Jos of Galati. Fascicle VI-Food Technology, 2017. 41(1): p. 50-61.
10. CEBİOĞLU, İ.K. and A.E. ÖNAL, İstanbul'da Bir İlçede Gıda Katkı Maddesi İçeren Bazı Besinlerin Tüketiminin ve Sağlığa Etkilerinin Araştırılması: Gıdaların Risk Analizi. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 2018. 3(1): p. 21-35.
11. El-Shenawy, M.A. and E.H. Marth, Sodium benzoate inhibits growth of or inactivates Listeria monocytogenes. Journal of Food Protection, 1988. 51(7): p. 525-530.
12. Simon, R.A., Adverse reactions to food additives. Current Allergy and Asthma Reports, 2003. 3(1): p. 62-66.
13. Lessof, M., Adverse reactions to food additives. Journal of the Royal College of Physicians of London, 1987. 21(4): p. 237.

14. Mephram, B., Food additives: an ethical evaluation. *British Medical Bulletin*, 2011. 99(1): p. 7-23.
15. Fennema, O.R., Food additives—an unending controversy. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 1987. 46(1): p. 201-203.
16. Gyawali, R. and S.A. Ibrahim, Natural products as antimicrobial agents. *Food control*, 2014. 46: p. 412-429.
17. Tajkarimi, M., S.A. Ibrahim, and D. Cliver, Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 2010. 21(9): p. 1199-1218.
18. Ayper, B. and S. Binokay, Gıda katkı maddeleri ve sağlığımıza etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2010. 19(3): p. 141-154.
19. Derneği, T.T., GKM ve Kontaminantları, 2011.
20. Ayaz, A. and M. Yurttagül, Besinlerdeki Toksik Öğeler-II. Ankara Sağlık Bakanlığı Yayınları, 2012(727).
21. Yang, B., Y. Chen, and J. Shi, Reactive oxygen species (ROS)-based nanomedicine. *Chemical reviews*, 2019. 119(8): p. 4881-4985.
22. Sies, H., Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 2015. 4: p. 180-183.
23. Güneş, M., Oksidatif strese maruz kalan ratlarda geraniol ve geraniol ksantat maddelerinin bazı metaller üzerine etkileri/Effects on geraniol and geraniol xanthate on some metals on rats induced oxidative stress. 2010.
24. MERAL, R., İ.S. DOĞAN, and G.S. KANBEROĞLU, Fonksiyonel gıda bileşeni olarak antioksidanlar. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 2012. 2(2): p. 45-50.
25. Maleta, H.S., ve ark., Ragam metode ekstraksi karotenoid dari sumber tumbuhan dalam dekade terakhir (telaah literatur). *Jurnal Rekayasa Kimia & Lingkungan*, 2018. 13(1): p. 40-50.
26. Aka, Ş., Polikistik over sendromlu hastalarda serum total oksidan, total antioksidan ve tiol disülfid, iskemi modifiye albumin seviyelerinin incelenmesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
27. Ray, P.D., B.-W. Huang, and Y. Tsuji, Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular signalling*, 2012. 24(5): p. 981-990.
28. Li, R., Z. Jia, and M.A. Trush, Defining ROS in biology and medicine. *Reactive oxygen species (Apex, NC)*, 2016. 1(1): p. 9.

29. Jeong, Y., J.W. Lim, and H. Kim, Lycopene inhibits reactive oxygen species-mediated NF- κ B signaling and induces apoptosis in pancreatic cancer cells. *Nutrients*, 2019. 11(4): p. 762.
30. ALTINER, A., H. Atalay, and T. Bilal, Serbest radikaller ve stres ile ilişkisi. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2018. 7(1): p. 51-55.
31. MEMİŞOĞULLARI, R., Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Duzce medical journal*, 2005. 7(3): p. 30-39.
32. McCord, J.M., Superoxide radical: controversies, contradictions, and paradoxes. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1995. 209(2): p. 112-117.
33. Fridovich, I., Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1983. 23(1): p. 239-257.
34. Winterbourn, C.C. and A.J. Kettle, Radical-radical reactions of superoxide: a potential route to toxicity. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003. 305(3): p. 729-736.
35. Özgün, G.S., Streptozotosin ile diyabet geliştirilmiş sıçanlarda nitrik oksit metabolizmasının incelenmesi. 2013.
36. Marshall, M.V., L.P. Cancro, and S.L. Fischman, Hydrogen peroxide: a review of its use in dentistry. *Journal of periodontology*, 1995. 66(9): p. 786-796.
37. Winterbourn, C.C., The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods in enzymology*, 2013. 528: p. 3-25.
38. Lipinski, B., Hydroxyl radical and its scavengers in health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2011. 2011.
39. Bruckdorfer, R., The basics about nitric oxide. *Molecular aspects of medicine*, 2005. 26(1-2): p. 3-31.
40. Hughes, M.N., Chemistry of nitric oxide and related species. *Methods in enzymology*, 2008. 436: p. 3-19.
41. Habib, S. and A. Ali, Biochemistry of nitric oxide. *Indian journal of clinical biochemistry*, 2011. 26(1): p. 3-17.
42. Panasenko, O., I. Gorudko, and A. Sokolov, Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Biochemistry (Moscow)*, 2013. 78(13): p. 1466-1489.
43. Winterbourn, C.C. and A.J. Kettle, Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radical Biology and Medicine*, 2000. 29(5): p. 403-409.

44. Davies, M.J., Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications*, 2003. 305(3): p. 761-770.
45. Kanofsky, J.R., Singlet oxygen production by biological systems. *Chemico-biological interactions*, 1989. 70(1-2): p. 1-28.
46. Crespi, S. and M. Fagnoni, Generation of alkyl radicals: from the tyranny of tin to the photon democracy. *Chemical reviews*, 2020. 120(17): p. 9790-9833.
47. Correia, J.T.M., ve ark., Photoinduced deaminative strategies: Katritzky salts as alkyl radical precursors. *Chemical Communications*, 2020. 56(4): p. 503-514.
48. Panov, A., Perhydroxyl radical (HO₂•) as inducer of the isoprostane lipid peroxidation in mitochondria. *Molecular biology*, 2018. 52(3): p. 295-305.
49. Cheeseman, K.H. and T.F. Slater, An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin*, 1993. 49(3): p. 481-493.
50. Gray, P. and A. Williams, The thermochemistry and reactivity of alkoxy radicals. *Chemical reviews*, 1959. 59(2): p. 239-328.
51. Yin, H., L. Xu, and N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical reviews*, 2011. 111(10): p. 5944-5972.
52. Alam, M.N., N.J. Bristi, and M. Rafiquzzaman, Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi pharmaceutical journal*, 2013. 21(2): p. 143-152.
53. Dontha, S., H. Kamurthy, and B. Mantripragada, Phytochemical and pharmacological profile of Ixora: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 2015. 6: p. 567-584.
54. HAMAMCIOGLU, A.C., Diyabette oksidatif stres ve antioksidanların rolü. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*, 2017. 1(1): p. 7-13.
55. Yashin, A., ve ark., Antioxidant activity of spices and their impact on human health: A review. *Antioxidants*, 2017. 6(3): p. 70.
56. Murdoch, R., ve ark., Effects of food additives on leukocyte histamine release in normal and urticaria subjects. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 1987. 21(4): p. 251.
57. Ova, G., Gıda Katkı Maddeleri (Altuğ, T., Ed). Meta Basım. Bornova, İzmir, 2001: p. 115-116.

58. Linke, B.G., T.A. Casagrande, and L.A. Cardoso, Food additives and their health effects: A review on preservative sodium benzoate. *African Journal of Biotechnology*, 2018. 17(10): p. 306-310.
59. Chipley, J.R., Sodium benzoate and benzoic acid. *Antimicrobials in foods*, 1993. 2: p. 11-48.
60. Jay, J.M., Food preservation with chemicals, in *Modern food microbiology* 1998, Springer. p. 273-303.
61. Piper, J.D. and P.W. Piper, Benzoate and sorbate salts: a systematic review of the potential hazards of these invaluable preservatives and the expanding spectrum of clinical uses for sodium benzoate. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2017. 16(5): p. 868-880.
62. Nair, B., Final report on the safety assessment of Benzyl Alcohol, Benzoic Acid, and Sodium Benzoate. *International Journal of Toxicology*, 2001. 20: p. 23-50.
63. Lennerz, B.S., ve ark., Effects of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Molecular genetics and metabolism*, 2015. 114(1): p. 73-79.
64. Shahmohammadi, M., M. Javadi, and M. Nassiri-Asl, An overview on the effects of sodium benzoate as a preservative in food products. *Biotechnology and Health Sciences*, 2016. 3(3): p. 7-11.
65. Praphanproj, V., ve ark., Three cases of intravenous sodium benzoate and sodium phenylacetate toxicity occurring in the treatment of acute hyperammonaemia. *Journal of inherited metabolic disease*, 2000. 23(2): p. 129-136.
66. Zengin, N., ve ark., The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, 2011. 49(4): p. 763-769.
67. Yadav, A., ve ark., Sodium benzoate, a food preservative, affects the functional and activation status of splenocytes at non cytotoxic dose. *Food and Chemical Toxicology*, 2016. 88: p. 40-47.
68. Nettis, E., ve ark., Sodium benzoate-induced repeated episodes of acute urticaria/angio-oedema: randomized controlled trial. *British Journal of Dermatology*, 2004. 151(4): p. 898-902.

69. Baldwin, E.A., M.O. Nisperos-Carriedo, and R.A. Baker, Use of edible coatings to preserve quality of lightly (and slightly) processed products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 1995. 35(6): p. 509-524.
70. Khoshnoud, M.J., ve ark., Effects of sodium benzoate, a commonly used food preservative, on learning, memory, and oxidative stress in brain of mice. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 2018. 32(2): p. e22022.
71. Wibbertmann, A., Benzoic acid and sodium benzoate 2000: World Health Organization.
72. Tarlo, S. and G. Sussman, Asthma and anaphylactoid reactions to food additives. *Canadian Family Physician*, 1993. 39: p. 1119.
73. Misel, M.L., ve ark., Sodium benzoate for treatment of hepatic encephalopathy. *Gastroenterology & hepatology*, 2013. 9(4): p. 219.
74. Özdemir, H., A.B. Turhan, and H. Arkoğlu, Potasyum sorbat, sodyum benzoat ve sodyum nitrit'in genotoksik etkilerinin araştırılması. *European Journal of Basic Medical Science*, 2012. 2: p. 34-40.
75. Stanojevic, D., ve ark., Antimicrobial effects of sodium benzoate, sodium nitrite and potassium sorbate and their synergistic action in vitro. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 2009. 15(4): p. 307-311.
76. Ju, H.K., J.H. Park, and S.W. Kwon, Evaluation of headspace-gas chromatography/mass spectrometry for the analysis of benzene in vitamin C drinks; pitfalls of headspace in benzene detection. *Biomedical Chromatography*, 2008. 22(8): p. 900-905.
77. Zhang, G. and Y. Ma, Spectroscopic studies on the interaction of sodium benzoate, a food preservative, with calf thymus DNA. *Food chemistry*, 2013. 141(1): p. 41-47.
78. Yücel, A., ve ark., Intravenous administration of caffeine sodium benzoate for postdural puncture headache. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 1999. 24(1): p. 51-54.
79. Wind, C.E. and L. Restaino, Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *Zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise. *Journal of Food Protection*, 1995. 58(11): p. 1257-1259.
80. Tsay, H.-J., ve ark., Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae. *Neurotoxicology and teratology*, 2007. 29(5): p. 562-569.

81. Toth, B., Lack of tumorigenicity of sodium benzoate in mice. *Toxicological Sciences*, 1984. 4(3part1): p. 494-496.
82. Sushma, S., ve ark., Sodium benzoate in the treatment of acute hepatic encephalopathy: a double-blind randomized trial. *Hepatology*, 1992. 16(1): p. 138-144.
83. Ryan, A., ve ark., The efficacy of sodium benzoate as an adjunctive treatment in early psychosis-CADENCE-BZ: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*, 2017. 18(1): p. 1-11.
84. Organization, W.H., Benzoic acid and sodium benzoate 2000: World Health Organization.
85. Yilmaz, B. and A.Z. Karabay, Food Additive Sodium Benzoate (NaB) Activates NF κ B and Induces Apoptosis in HCT116 Cells. *Molecules*, 2018. 23(4).
86. Büyükbayram, H.İ., Prepubertal dönem süresince yavru sıçanlarda monosodyum glutamata maruziyetin öğrenme ve nörodavranış üzerine etkileri. 2018.
87. Karakahya, F., Tavuk embriyonal gelişimi üzerine gıda katkı maddesi sodyum benzoatın embriyotoksik etkilerinin histolojik yönden belirlenmesi, 2011, Fen Bilimleri Enstitüsü.
88. YÜZBAŞIOĞLU, D., N. Zengin, and Ü. Fatma, Gıda koruyucuları ve genotoksisite testleri. *Gıda*, 2014. 39(3): p. 179-186.
89. Brahmachari, S., A. Jana, and K. Pahan, Astroglial Inflammatory responses and a food additive reduces microglial and sodium benzoate, a metabolite of cinnamon. *J Immunol*, 2009. 183: p. 5917-5927.
90. Fujitani, T., Short-term effect of sodium benzoate in F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicology letters*, 1993. 69(2): p. 171-179.
91. Sarah, B., ve ark., Intrastromal injection of bevacizumab in the management of corneal neovascularization: about 25 eyes. *Journal of ophthalmology*, 2016. 2016.
92. Manzano, R.P., ve ark., Inhibition of experimental corneal neovascularisation by bevacizumab (Avastin). *British journal of ophthalmology*, 2007. 91(6): p. 804-807.
93. Bilgihan, K., ve ark., Keratocyte apoptosis and corneal antioxidant enzyme activities after refractive corneal surgery. *Eye*, 2002. 16(1): p. 63-68.

94. Lu, Y.-P., ve ark., Caffeine and caffeine sodium benzoate have a sunscreen effect, enhance UVB-induced apoptosis, and inhibit UVB-induced skin carcinogenesis in SKH-1 mice. *Carcinogenesis*, 2007. 28(1): p. 199-206.
95. Walczak-Nowicka, Ł.J. and M. Herbet, Sodium Benzoate—Harmfulness and Potential Use in Therapies for Disorders Related to the Nervous System: A Review. *Nutrients*, 2022. 14(7): p. 1497.
96. Ellis, L.M. and P. Kirkpatrick, Bevacizumab. *Nature reviews Drug discovery*, 2005. 4.
97. Kümler, I., O.G. Christiansen, and D.L. Nielsen, A systematic review of bevacizumab efficacy in breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 2014. 40(8): p. 960-973.
98. Braghiroli, M.I., J. Sabbaga, and P.M. Hoff, Bevacizumab: overview of the literature. *Expert review of anticancer therapy*, 2012. 12(5): p. 567-580.
99. Keating, G.M., Bevacizumab: a review of its use in advanced cancer. *Drugs*, 2014. 74(16): p. 1891-1925.
100. Croom, K.F. and S. Dhillon, Bevacizumab. *Drugs*, 2011. 71(16): p. 2213-2229.
101. Mukherji, S., Bevacizumab (avastin). *American journal of neuroradiology*, 2010. 31(2): p. 235-236.
102. Falk, A.T., ve ark., Bevacizumab: a dose review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2015. 94(3): p. 311-322.
103. Gunther, J.B. and M.M. Altaweel, Bevacizumab (Avastin) for the treatment of ocular disease. *Survey of ophthalmology*, 2009. 54(3): p. 372-400.
104. Nalluri, S.R., ve ark., Risk of venous thromboembolism with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. *Jama*, 2008. 300(19): p. 2277-2285.
105. Kazazi-Hyseni, F., J.H. Beijnen, and J.H. Schellens, Bevacizumab. *The oncologist*, 2010. 15(8): p. 819.
106. McCormack, P.L. and S.J. Keam, Spotlight on Bevacizumab in Metastatic Colorectal Cancer. *BioDrugs*, 2008. 22(5): p. 339-341.
107. Badgwell, B., ve ark., Management of bevacizumab-associated bowel perforation: a case series and review of the literature. *Annals of oncology*, 2008. 19(3): p. 577-582.
108. Norrby, K., In vivo models of angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2006. 10(3): p. 588-612.

109. Baum, O., ve ark., VEGF-A Promotes Intussusceptive Angiogenesis in the Developing Chicken Chorioallantoic Membrane. *Microcirculation*, 2010. 17(6): p. 447-457.
110. Dimitropoulou, C., ve ark., The vascular architecture of the chick chorioallantoic membrane: sequential quantitative evaluation using corrosion casting. *Angiogenesis*, 1998. 2(3): p. 255-263.
111. Ribatti, D., The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 2008. 49(2): p. 131-135.
112. Nowak-Sliwinska, P., T. Segura, and M.L. Iruela-Arispe, The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis*, 2014. 17(4): p. 779-804.
113. Ekin, E., ve ark., Tavuk Embriyosu Koryoallantoik Membranında Görülen Anjiyogenez Sürecinde C-Tipi Natriüretik Peptid-3 ve Natriüretik Peptid Reseptör-B mRNA İfadelerinin Analizi: Tanımlayıcı Bir Çalışma. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 47(2): p. 165-175.
114. Deryugina, E.I. and J.P. Quigley, Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochemistry and cell biology*, 2008. 130(6): p. 1119-1130.
115. Valdes, T., D. Kreutzer, and F. Moussy, The chick chorioallantoic membrane as a novel in vivo model for the testing of biomaterials. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 2002. 62(2): p. 273-282.
116. Auerbach, R., W. Auerbach, and I. Polakowski, Assays for angiogenesis: a review. *Pharmacology & therapeutics*, 1991. 51(1): p. 1-11.
117. Auerbach, W. and R. Auerbach, Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacology & therapeutics*, 1994. 63(3): p. 265-311.
118. Fagiani, E. and G. Christofori, Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer letters*, 2013. 328(1): p. 18-26.
119. Klagsbrun, M. and M.A. Moses, Molecular angiogenesis. *Chemistry & biology*, 1999. 6(8): p. R217-R224.
120. Pressman, P., ve ark., Food additive safety: A review of toxicologic and regulatory issues. *Toxicology Research and application*, 2017. 1: p. 2397847317723572.

121. Ribatti, D., Chicken chorioallantoic membrane angiogenesis model, in Cardiovascular development 2012, Springer. p. 47-57.
122. Larger, E., ve ark., Hyperglycemia-induced defects in angiogenesis in the chicken chorioallantoic membrane model. Diabetes, 2004. 53(3): p. 752-761.
123. Özgürtaş, T., Anjiyogeneizde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. Gülhane Tıp Dergisi, 2009. 51(1): p. 67-69.
124. Gaur, H., ve ark., Sodium benzoate induced developmental defects, oxidative stress and anxiety-like behaviour in zebrafish larva. Biochemical and biophysical research communications, 2018. 502(3): p. 364-369.
125. El-Shennawy, L., ve ark., Dose-dependent reproductive toxicity of sodium benzoate in male rats: Inflammation, oxidative stress and apoptosis. Reproductive Toxicology, 2020. 98: p. 92-98.
126. Khan, I.S., ve ark., Toxicological impact of sodium benzoate on inflammatory cytokines, oxidative stress and biochemical markers in male Wistar rats. Drug and Chemical Toxicology, 2022. 45(3): p. 1345-1354.
127. Neufeld, G., ve ark., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. The FASEB journal, 1999. 13(1): p. 9-22.
128. Uronis, H.E., ve ark., A phase II study of capecitabine, oxaliplatin, and bevacizumab in the treatment of metastatic esophagogastric adenocarcinomas. The oncologist, 2013. 18(3): p. 271-272.
129. Yildiz, C., ve ark., Anti-angiogenic effects of diltiazem, imatinib, and bevacizumab in the CAM assay. 2013.

6-EKLER

EK-1. İntihal Raporu

SODYUM BENZOATIN KORYOALLANTOİK MEMBRAN (CAM) MODELİNDE ANJİYOGENEZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 5	% 4	% 2	% 1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.alanya.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	www.hifishock.org İnternet Kaynağı	<% 1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	comum.rcaap.pt İnternet Kaynağı	<% 1
5	ihsic.mehmetakif.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.karatay.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	www.bombascah.com İnternet Kaynağı	<% 1
8	dergiler.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

ÖZGEÇMİŞ

Adı SOYADI: Elina DİNÇ

Eğitim:

Lise: Mithatpaşa Anadolu Lisesi (2013)

Lisans: Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü
Fen-Edebiyat Fakültesi (2019)

Erasmus: University of Technology and Life Sciences in Bydgoszcz
(Uniwersytet Technologiczno - Przyrodniczy – the UTP) (Dönem Öğrencisi 2017)

Staj: University of Technology and Life Sciences in Bydgoszcz (Uniwersytet
Technologiczno - Przyrodniczy – the UTP)

Yüksek Lisans: Alaaddin Keykubat Üniversitesi, Moleküler Tıp Anabilim Dalı
Tıp Fakültesi Tezli Yüksek Lisans (2020-2022)

Bilimsel Faaliyetler: Editör Asistan- Turkish Journal Of Health And Sport

