

BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN GENOTOKSİK ETKİLERİ

Serkan YILMAZ

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KASIM 2008

ANKARA

Serkan YILMAZ tarafından hazırlanan BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN GENOTOKSİK ETKİLERİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Fatma ÜNAL

.....

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

(Prof. Dr. Fatma ÜNAL)

.....

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

(Prof. Dr. Eşref YÜKSEL)

.....

(Biyoloji, Gazi Üniversitesi)

(Prof. Dr. Sebahattin Özcan)

.....

(Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi)

(Prof. Dr. Orhan ARSLAN)

.....

(Biyoloji Eğitimi, Gazi Üniversitesi)

(Prof. Dr. Cafer Sevimay)

.....

(Tarla Bitkileri, Ankara Üniversitesi)

Tarih:

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Nail ÜNSAL

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Serkan YILMAZ

BAZI GIDA KATKI MADDELERİNİN GENOTOKSİK ETKİLERİ**(Doktora Tezi)****Serkan YILMAZ****GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ****Kasım 2008****ÖZET**

Bu çalışmada, gıdalarda sıklıkla kullanılan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonat ve sitrik asit ile fosforik asit karışımının *in vitro* genotoksik etkileri, insan perferal kan lenfositlerinde, kromozom anormalliği (KA), kardeş kromatit değişimi (KKD), mikronükleus (MN) ve komet testleri kullanılarak belirlenmiştir. Sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 µg/ml, fosforik asitin 25, 50, 100 ve 200 µg/ml, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/ml, kalsiyum propiyonatın 50, 100, 200 ve 1000 µg/ml ile sitrik asit ve fosforik asit karışımının 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonları kullanılmıştır. Yapılan analizlerde, kullanılan katkı maddelerinin tümü kromozomal anormallik, kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus frekansını kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artırmıştır. Komet testinde ise, primer DNA hasarı sitrik asitin en yüksek dozunda, diğer uygulamalarda ise hemen hemen tüm dozlarda kontrole göre anlamlı oranda artış göstermiştir. Komet kuyruk yoğunluğu ve komet kuyruk uzunluğu, kontrole göre tüm uygulamalarda önemli düzeyde artmıştır. Mitotik indeks, tüm uygulamalarda kontrole göre anlamlı düşüş göstermiştir. Replikasyon indeksi ve nükleer bölünme indeksi, çalışmada kullanılan maddeler tarafından herhangi bir şekilde etkilenmemiştir. Elde edilen bulgular, çalışmada kullanılan maddelerin *in vitro* kültüre alınmış ve izole edilmiş insan lenfositlerinde klastojenik, mutajenik ve sitotoksik etkili olduğunu ayrıca primer DNA hasarını indüklediğini göstermiştir.

Bilim Kodu : 203.1.048

Anahtar Kelimeler : Sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit, kalsiyum propiyonat, kromozomal anormallik (KA), kardeş kromatid değişimi (KKD), mikronükleus (MN), komet testi, mitotik indeks (MI), replikasyon indeksi (Rİ), nükleer bölünme indeksi (NBİ), genotoksik etki

Sayfa Adedi : 112

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

THE GENOTOXIC EFFECTS OF SOME FOOD ADDITIVES

(Ph. D. Thesis)

Serkan YILMAZ

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

November 2008

ABSTRACT

In this study, the *in vitro* genotoxic effects of citric acid, phosphoric acid, benzoic acid, calcium propionate and combination of citric acid and phosphoric acid, frequently used in foods, have been determined in human peripheral blood lymphocytes by using chromosome aberrations (CAs), sister chromatid exchanges (SCEs), micronuclei (MN) and comet assay. 50, 100, 200 and 3000 µg/ml concentrations of citric acid; 25, 50, 100 and 200 µg/ml concentrations of phosphoric acid; 50, 100, 200 and 500 µg/ml concentrations of benzoic acid; 50, 100, 200 and 1000 µg/ml concentrations of calcium propionate; 25, 50, 100 and 200 µg/ml concentrations of citric acid and phosphoric acid combination were used. All of the additives used in this study statistically increased the frequency of chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei compared to controls. The primary DNA damage in comet assay significantly increased by the highest concentration of citric acid and by almost all the concentrations of other additives. The comet tail intensity and comet tail length significantly increased compared to controls. Mitotic index statistically decreased in all the treatments compared to controls. Replication and nuclear division indices were not effected by the additives used. The results of experiments showed that the additives used in this study have clastogenic,

mutagenic, cytotoxic and also DNA damaging effects in cultured and isolated human lymphocytes.

Science Code : 203.1.048

Key Words : Citric acid, phosphoric acid, benzoic acid, calcium propionate, chromosomal aberration (CA), sister chromatid exchange (SCE), micronuclei (MN), comet assay, mitotic index (MI), replication index (RI), nuclear division index (NDI), genotoxic effect

Page Number: 112

Adviser : Prof. Dr. Fatma ÜNAL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında her konuda beni destekleyen, tecrübesi, bilgileri ve önerileri ile yönlendiren, saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Fatma ÜNAL'a; tez izleme komitesinde yer alan sayın hocalarım Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN ve Prof. Dr. Eşref YÜKSEL'e tezime yaptıkları katkılardan dolayı ayrıca teşekkür ediyorum. Çalışmalarım boyunca bilgi ve görüşlerinden her zaman yararlandığım, değerli dost ve hocalarım Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY'a ve Dr. Mustafa ÇELİK'e, deneysel aşamaların bir bölümünde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Gonca ÇAKMAK DEMİRCİGİL'e ve laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlara saygı ve sevgilerimle teşekkür ederim. Ayrıca doktora çalışmam boyunca maddi, manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Araş. Gör. Ebru YILMAZ'a ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri 05/2006-41 No'lu projesiyle desteklenmiştir. Maddi katkılarından dolayı Gazi Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Gıda Katkı Maddeleri.....	4
2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanımı	8
2.2.1. Gıda katkı maddelerinin güvenli kullanımı için çalışan uluslararası kuruluşlar.....	10
2.3. Antioksidan Gıda Katkı Maddeleri.....	10
2.4. Sitrik Asit (E-330).....	11
2.5. Fosforik Asit (E-338)	13
2.6. Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri	14
2.7. Benzoik Asit (E-210).....	15
2.8. Kalsiyum Propiyonat (E-282)	17
2.9. Mutajenite Testleri	18
2.9.1. Kromozom anormallikleri metodu.....	20

Sayfa

2.9.2. Kardeş kromatit değişimi=kkd (sister chromatid exchange -sce) metodu	21
2.9.3. Mikronükleus (mn) metodu.....	22
2.9.4. Comet (kuyruklu yıldız) (single cell gel electrophoresis) metodu.....	23
3. MATERYAL VE METOT	27
3.1. Materyal.....	27
3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal.....	27
3.1.2. Test materyali	27
3.2. Metot	29
3.2.1. Kültüre alınmış insan lenfositlerindeki çalışmalar	29
3.2.2. izole edilmiş insan lenfositlerindeki çalışmalar	33
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	36
4.1. Sitrik Asit Uygulaması	36
4.2. Fosforik Asit Uygulaması	44
4.3. Benzoik Asit Uygulaması.....	52
4.4. Kalsiyum Propiyonat Uygulaması.....	61
4.5. Sitrik Asit ve Fosforik Asit Birlikte Uygulaması	69
5. TARTIŞMA	77
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ.....	108

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Sitrik asidin gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri.....	11
Çizelge 2.2. Sitrik asidin çeşitli canlı gruplarında bazı LD ₅₀ değerleri	12
Çizelge 2.3. Fosforik asidin gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri	14
Çizelge 2.4. Fosforik asidin çeşitli canlı gruplarında bazı LD ₅₀ değerleri.....	14
Çizelge 2.5. Benzoik asidin gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri	15
Çizelge 2.6. Benzoik asidin çeşitli canlı gruplarında bazı LD ₅₀ değerleri	17
Çizelge 2.7. Kalsiyum propiyonatın gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri	17
Çizelge 2.8. Kalsiyum propiyonatın çeşitli canlı gruplarında bazı LD ₅₀ değerleri	18
Çizelge 4.1. Sitrik asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları	36
Çizelge 4.2. Sitrik asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	41
Çizelge 4.3. Sitrik asitin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	42
Çizelge 4.4. Sitrik asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	43
Çizelge 4.5. Fosforik asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları	44
Çizelge 4.6. Fosforik asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	48
Çizelge 4.7. Fosforik asitin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	49
Çizelge 4.8. Fosforik asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	50

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.9. Benzoik asit uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları	52
Çizelge 4.10. Benzoik asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	57
Çizelge 4.11. Benzoik asitin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	58
Çizelge 4.12. Benzoik asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	59
Çizelge 4.13. Kalsiyum propiyonat uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	61
Çizelge 4.14. Kalsiyum propiyonatın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	65
Çizelge 4.15. Kalsiyum propiyonatın insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	66
Çizelge 4.16. Kalsiyum propiyonat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	67
Çizelge 4.17. Sitrik asit ve fosforik asit uygulaması ile insan periferal lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları.....	69
Çizelge 4.18. Sitrik asit ve fosforik asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi	73
Çizelge 4.19. Sitrik asit ve fosforik asitin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi.....	74
Çizelge 4.20. Sitrik asit ve fosforik asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı	76

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekrozis.....	23
Şekil 2.2. Comet Assay Tekniği Kullanılarak İncelenebilecek Hücre Tipleri	26
Şekil 3.1. Benzoik asitin yapısal formülü.....	28
Şekil 3.2. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri.....	33

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	37
Resim 4.2. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	38
Resim 4.3. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	39
Resim 4.4. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	40
Resim 4.5. Sitrik asit uygulamasıyla insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri	41
Resim 4.6. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler	42
Resim 4.7. Sitrik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü	43
Resim 4.8. Fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	45
Resim 4.9. Fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	46
Resim 4.10. Fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	47
Resim 4.11. Fosforik asit uygulamasıyla insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri	48
Resim 4.12. Fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler	49
Resim 4.13. Fosforik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü	51
Resim 4.14. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	53

Resim	Sayfa
Resim 4.15. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	54
Resim 4.16. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	55
Resim 4.17. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	56
Resim 4.18. Benzoik asit uygulamasıyla insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri	57
Resim 4.19. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler	58
Resim 4.20. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler	59
Resim 4.21. Benzoik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü	60
Resim 4.22. Kalsiyum propiyonat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	62
Resim 4.23. Kalsiyum propiyonat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	63
Resim 4.24. Kalsiyum propiyonat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	64
Resim 4.25. Kalsiyum propiyonat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri	66
Resim 4.26. Kalsiyum propiyonat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler	67
Resim 4.27. Kalsiyum propiyonat ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü	68
Resim 4.28. Sitrik asit ve fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	70
Resim 4.29. Sitrik asit ve fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	71

Resim	Sayfa
Resim 4.30. Sitrik asit ve fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler	72
Resim 4.31. Sitrik asit ve fosforik asit uygulamasıyla insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri	73
Resim 4.32. Sitrik asit ve fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler	75
Resim 4.33. Sitrik asit ve fosforik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µg/ml	Mikrogram/ Mililitre
mg/kg	Miligram/kilogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
LD ₅₀	Letal doz ₅₀
rpm	Devir sayısı
V	Volt
mA	Miliamper
mm	Milimetre
Kısaltmalar	Açıklama
CAs	Chromosomal aberretions
Cyt-B	Sitokalsin-B
DNA	Deoksiribonükleikasit
KA	Kromozoamal anormallikler
KKD	Kardeş kromatid değişimi
Mİ	Mitotik indeks
MMC	Mitomycin-C
MN	Mikronükleus
NBİ	Nükleer bölünme indeksi
Rİ	Replikasyon indeksi

Kısaltmalar**Açıklama****SCE**

Sister chromatid exchange

BrdU

Bromodeoksiüridin

SSC

Salin sitrat tamponu

DMSO

Dimetil sülfoksit

H₂O₂

Hidrojen Peroksit

EDTA

Etilendiaminotetra asetik asit

NaOH

Sodyum Hidroksit

NaCl

Sodyum Klorür

PBS

Fosfat Tamponu

S9

Karaciğer özütü

1. GİRİŞ

20. yüzyılın başında, çoğu doğal kaynaklı olmak üzere bir kaç bin kimyasal madde kullanılmakta iken, son yıllarda yaklaşık 80.000 civarında kimyasal madde, çeşitli amaçlar için kullanılmakta ve bu sayı her geçen yıl artmaktadır. Kimyasal maddelerin kullanımı özellikle 1940'lardan sonra hızla artmış ve 1985 yılında 250 milyon ton/yıl'a yükselmiştir. Bugün bu rakam 400 milyon ton/yıl'a ulaşmıştır. Kimyasal maddelerin yoğun ve nispeten kontrolsüz olarak kullanılmaya başlandığı yıllarda yapılan hatalardan dolayı insan sağlığı ve çevre zarar görmüştür. Gerek kimyasal maddelerin her alanda yoğun olarak kullanılmaya başlanması gerekse kontrolsüz kullanımın yarattığı ciddi sağlık ve çevre sorunları, toplumlarda kimyasal kullanımına karşı korku ve tepkilerin oluşmasına neden olmuştur. Kimyasalların insan sağlığı üzerindeki etkileri devamlı tartışma konusu olmaktadır [Karakaya A. E., 2008]. Özellikle 1960'lerden sonra, toksikoloji bilimindeki hızlı gelişmenin yanı sıra, kimyasal maddeler için risk yönetimi uygulamalarının geliştirilmesi, güvenli kimyasal kullanımı olanağını getirmiştir. Bugün ilaç, gıda katkı maddeleri, kozmetik, tarım ilacı, endüstri kimyasalı olarak kullanılan her kimyasalın insan sağlığı ve çevreye olan etkisi ayrıntılı olarak incelenmekte, insan sağlığı ve çevre üzerinde kabul edilemez ölçüde risk taşıyanların kullanımına izin verilmemektedir [Beier, 1990; Sarıkaya, 2005].

Artan dünya nüfusu yeni gıda kaynaklarının bulunmasını zorunlu kıldığı gibi, mevcut kaynakların daha verimli kullanılmasını da zorunlu hale getirmiştir. Ayrıca hızlı endüstrileşme ve kentleşme, hazır yiyeceklere olan talebi de arttırmıştır. Bundan dolayı da, gıdaların uzun süre bozulmaksızın saklanabilmesi önem kazanmıştır. Son 30 yıldır, başta gelişmiş ülkelerde olmak üzere, yiyeceklere katılan kimyasal maddelerin sayıları hızlı bir şekilde artmıştır. Örneğin sadece İngiltere'de 1 yıl içerisinde kullanılan kimyasal maddelerin toplam miktarının 200.000 tonu geçtiği sanılmaktadır [Arslan, 2004].

Gıda katkı maddeleri, çeşitli amaçlar için kullanılan kimyasal madde grupları içerisinde en çok dikkati çeken gruptur. Çünkü bu maddeler, kişinin istemi dışında hayatı boyunca maruz kalabildiği maddelerdir. Bu maddeler genel anlamda “gıdaların özelliklerini istenilen biçimde etkilemek amacıyla kullanılan maddeler” olarak tanımlanmaktadır. Bu özellikler arasında görünüm, lezzet, doku, besleyici değer ve depolama ömrü sayılabilir [Altuğ ve ark., 2000].

Gıda katkı maddeleri; yiyeceklerin hazırlanması sırasında besinlerin bozulmasını önlemek, tadını, yapısını ya da besin değerini artırmak amacıyla besinlere eklenmiş maddelerdir. Önceleri bu amaçla doğal katkı maddeleri kullanılmakla birlikte son yıllarda teknolojinin gelişmesi ile birlikte, üretimi hızlandıran ve maliyeti düşüren suni katkı maddeleri de kullanılmaya başlanmıştır [Gürsoy, 2001]. Gıdalara katılan kimyasal maddeler mikrobiyolojik bozulmayı önleme ve dayanıklılığı artırma, besleyici değeri koruma, teknolojik işlemlere yardımcı olma, renk, görünüş, lezzet, koku gibi duysal özellikleri düzeltme gibi pek çok amaçla kullanılan maddelerdir. Bu maddeler gelişigüzel ve tüzük dışı kullanıldığında, tüketiciler arasında alerjik ve toksik reaksiyonların görülmesine neden olabilmektedir [Arslan, 2004]. Kullanılan gıda katkı maddeleri sağlığa zarar vermeyecek miktarda kullanılsalar bile, bu maddelerin zaman içerisinde vücutta birikerek dokularda tahribata neden olabileceği, dolayısıyla insan sağlığını doğrudan ya da dolaylı olarak tehdit edebileceği göz önünde bulundurulması gereken önemli hususlardır. İşte bu risk nedeniyle gıda katkı maddeleri de dâhil olmak üzere çeşitli maddelerin mutajenik, klastojenik, aneugenik etkileri *in vivo* ve *in vitro* testlerle araştırılmaktadır. Yapılan bir çok araştırmada kimyasalların mutajenik etkileri ile kanser oluşturma riski arasında pozitif bir ilişki olduğu saptanmıştır [Kaderlik ve ark., 1992]

Çeşitli kimyasalların mutajenik, klastojenik, aneugenik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan *in vitro* test yöntemlerinden insan lenfosit kültürü oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Periferik kandaki beyaz kan hücrelerinden lenfositler kullanılarak, çeşitli kimyasalların genotoksik etkili olup olmadıkları, kromozomal anormallik,

kardeş kromatit değişimi ve mikronükleus testi kullanılarak değerlendirilebilmektedir. Ayrıca kimyasalların primer DNA hasarını indükleyip ind klemediği de, son yıllarda geliştirilen komet testi kullanılarak değerlendirilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, gıdalarda sıklıkla kullanılan katkı maddeleri olan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın genotoksik etkilerini, kültüre alınmış insan periferel lenfositlerinde kromozom anormalliği (KA) testi, kardeş kromatit değişimi (KKD) testi, mikronükleus (MN) testi ve izole edilmiş lenfositlerde komet testi kullanarak *in vitro* yöntemlerle araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Gıda Katkı Maddeleri

1950’li yıllardan bu yana hızla artan dünya nüfusuna paralel olarak gıda maddelerine duyulan gereksinimin çoğalması, şehirleşme ve insanların yaşam biçimlerinde oluşan değişimler, yüksek kalitede ve çeşitlilikteki gıda maddelerine duyulan ihtiyaç, seyahat ve nakil imkânlarının gelişmesi, yeni gıda işleme ve pazarlama yöntemleri nedeniyle katkı maddelerinin üretimi ve gıdalarda kullanımı büyük oranda artmıştır. Gıdaların organoleptik özelliklerinin düzeltilmesi, depolama ömrünün uzatılması, mikrobiyal kaynaklı bozunmaların engellenmesi ve gıda işlemede yardımcı olmak gibi nedenlerle kullanılan katkı maddeleri, gıda endüstrisinin vazgeçilmez bir parçasını oluşturmaktadır. Bu maddelerin gıdalarda güvenilir bir şekilde kullanımı ise, tüketiciler açısından bu konunun en önemli yönünü oluşturmaktadır. Bu nedenle dünyadaki pek çok uluslar arası ve ulusal kuruluşlar, katkı maddelerinin gıdalarda güvenilir bir şekilde kullanımları amacıyla spesifikasyonlar ve sınırlamalar getirmişlerdir. Ülkemizde de 6 Mart 1988’de yürürlüğe giren “gıda katkı maddeleri yönetmeliği” gıda katkı maddelerinin kullanılmasına ilişkin tanım ve kısaltmaları, genel hükümleri, işaretleme ve etiketleme ile ilgili prensipleri ve teknik hükümleri kapsamaktadır [Altuğ ve ark., 2000].

Gıda katkı maddeleri, Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğinde “Tek başına gıda olarak tüketilmeyen veya gıdanın karakteristik bileşeni olarak kullanılmayan, tek başına besleyici değeri olan veya olmayan, teknolojik bir amaç doğrultusunda üretim, işleme, hazırlama, ambalajlama, taşıma veya depolama aşamalarında gıdaya ilave edilmesi sonucu, kendisi ya da yan ürünleri, doğrudan ya da dolaylı olarak o gıdanın bileşeni olan maddeler” olarak tanımlanmıştır. Bu tebliğ kapsamında, renklendiriciler ve tatlandırıcılar dışında yer alan gıda katkı maddelerinin fonksiyonlarının tanımları ise aşağıdaki şekilde verilmiştir.

- a) *Ambalajlama gazları*: Gıda maddesi kaba yerleştirilmeden önce, yerleştirilirken veya yerleştirildikten sonra kap içine verilen hava dışındaki gazlardır.
- b) *Antioksidanlar*: Yağların acılaşması ve renk değişikliği gibi oksidasyonun neden olduğu bozulmaları önleyerek, gıdaların raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddelerdir.
- c) *Aroma arttırıcılar*: Gıdanın mevcut tat ve/veya kokusunu artıran maddelerdir.
- ç) *Asitler*: Asitliği arttıran ve/veya gıdada ekşi bir tat oluşumunu sağlayan maddelerdir.
- d) *Asitlik düzenleyiciler*: Gıdaların asitlik veya alkaliliğini değiştiren veya kontrol eden maddelerdir.
- e) *Emülgatörler*: Bir gıda maddesinde, yağ ve su gibi birbiri ile karışmayan iki veya daha fazla fazın homojen bir karışım oluşturmalarını veya oluşan homojen karışımın sürekliliğini sağlayan maddelerdir.
- f) *Emülsifiye edici tuzlar*: Peynirde bulunan proteinleri dispers hale getirerek yağ ve diğer bileşenlerin homojen dağılımını sağlayan maddelerdir.
- g) *Hacim arttırıcılar*: Gıdaların faydalanılabilir enerji değerini önemli oranda arttırmadan, gıdaların hacmini arttıran maddelerdir.
- ğ) *İtici gazlar*: Gıdanın bulunduğu kaptan dışarı çıkmasını sağlayan hava dışındaki gazlardır.
- h) *Jelleştiriciler*: Jel oluşumu ile gıdada farklı bir yapı oluşturan maddelerdir.
- ı) *Kabartıcılar*: Gaz oluşturarak hamurun/yumurtalı soslu hamurun hacmini artıran madde veya madde karışımlarıdır.
- i) *Kıvam arttırıcılar*: Gıdanın kıvamını arttıran maddelerdir.
- j) *Koruyucular*: Gıdaların mikroorganizmalarla bozulmalarını önleyerek, raf ömürlerinin uzatılmasını sağlayan maddelerdir.
- k) *Köpük oluşturunucular*: Sıvı veya katı gıdalarda, gaz fazın homojen dağılımını sağlayan maddelerdir.
- l) *Köpüklenmeyi önleyiciler*: Köpüklenmeyi azaltan veya önleyen maddelerdir.
- m) *Metal bağlayıcılar*: Metalik iyonlarla kimyasal kompleks oluşturan maddelerdir.
- n) *Modifiye nişastalar*: Fiziksel veya enzimatik uygulamaya, asit veya alkali ile inceltmeye veya ağartmaya tabi tutulmuş olsun veya olmasın yenilebilir

nişastaların bir veya daha fazla kimyasal işleme tabi tutulması ile elde edilen maddelerdir.

- o) *Nem vericiler*: Gıda maddelerinin düşük nemli ortamdan etkilenip kurumasını önleyen veya toz gıdaların sıvı ortamlarda çözünmesini kolaylaştıran maddelerdir.
- ö) *Parlatıcılar*: Yağlayıcılar da dahil, gıdaların dış yüzeyine uygulandığında parlak bir görünüm veren veya koruyucu bir tabaka sağlayan maddelerdir.
- p) *Sertleştiriciler*: Meyve ve sebzelerin yapısını koruyan ya da dokularını sert veya gevrek hale getiren veya mevcut jelleştiriciler ile reaksiyona girerek jel oluşumunu sağlayan veya güçlendiren maddelerdir.
- r) *Stabilizörler*: Gıdaların fiziko-kimyasal durumlarını korumalarını sağlayan; gıdada bulunan iki veya daha fazla birbiri ile karışmayan fazın homojen dağılımının sürekliliğini sağlayan, gıdaların var olan renklerini koruyan veya kuvvetlendiren, proteinler arası çapraz bağ oluşturarak gıda parçacıklarının bağlanmasının sağlanması gibi gıdaların bağlanma kapasitelerini artıran maddelerdir.
- s) *Taşıyıcılar*: Taşıyıcı çözücüler dahil olmak üzere, gıda katkı maddelerini ve aromaları çözmek, seyreltmek veya bunların dağılımını sağlamak için kullanılan ya da herhangi bir teknolojik etki göstermeden gıda katkı maddeleri ve aromaları fiziksel yollarla modifiye ederek, bu maddelerin teknolojik fonksiyonlarını değiştirmeden, uygulama ve kullanımını kolaylaştıran maddelerdir.
- ş) *Topaklanmayı önleyiciler*: Gıda parçacıklarının birbirine yapışma eğilimini azaltan veya önleyen maddelerdir.
- t) *Un işlem maddeleri*: Hamurun işlenme ve pişirilme kalitesini geliştirmek amacı ile una veya hamura ilave edilen, emülgatörler dışındaki maddelerdir.

Yine Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinin 5. maddesinin a ve b bendinde hangi maddelerin gıda katkı maddesi olarak kullanılamayacağı belirtilmiştir. Bunlar;

- 1) İşlem yardımcıları,
- 2) Bitki üretiminde bitkileri korumak için kullanılan maddeler,
- 3) Aromalar,
- 4) Gıda maddelerine beslenme ögesi olarak katılan mineral vitamin, iz elementler ve benzeri ürünler,

- 5) Pektin içeren maddeler ve kurutulmuş elma posası veya turunçgillerin kabuğundan veya her ikisinin karışımından, seyreltik asit muamelesini takiben sodyum ve potasyum tuzları ile kısmi nötralizasyon sonucu elde edilen türev maddeler (sıvı pektin),
- 6) Sakız mayaları,
- 7) Beyaz veya sarı dekstrin, kavrulmuş veya dekstrine edilmiş nişasta, asit veya alkali uygulaması ile modifiye edilmiş nişasta, ağartılmış nişasta, fiziksel olarak modifiye edilmiş nişasta ve amilolitik enzim uygulamasına tabi tutulmuş nişasta,
- 8) Amonyum klorür,
- 9) Kan plazması, yenilebilir jelatin, protein hidrolizatları ve bunların tuzları, süt proteini ve gluten,
- 10) Glutamik asit, glisin, sistein, sistin ve bunların tuzları dışındaki aminoasitler ve bunların tuzları ve katkı fonksiyonuna sahip olmayanları,
- 11) Kazeinatlar ve kazein,
- 12) İnülin.

Hazır besinlerdeki katkı maddelerinin kullanımında, üreticiler özellikle aşağıdaki kıstasları dikkate almaktadırlar.

- Besinsel değeri artırmak,
- Kaliteyi artırmak,
- İsrafı azaltmak,
- Saklama kalitesini artırmak,
- Gıdanın kabulünü artırmak,
- Hazırlamayı kolaylaştırmak,
- Gıdayı daha kullanışlı hale getirmek.

Dünyada kullanımına onay verilen yaklaşık 2800 katkı maddesinin 300 tanesine Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği'nde gıdalarda değişik miktarlarda kullanılmasına izin verilmiştir. Avrupa Birliği'nde kullanımına onay verilen katkı maddesi sayısı ise 297'dir [Sarıkaya, 2005].

2.2. Gıda Katkı Maddelerinin Kullanımı

Gıda katkı maddeleri, insanların doğrudan ya da dolaylı olarak maruz kaldıkları kimyasallar içinde önemli bir yere sahiptir. Zira dünyada milyonlarca insan bu maddelere istekleri dışında maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle bir gıda katkı maddesinin kullanıma sunulmadan önce, ulusal ve uluslararası birçok kuruluşun onayından geçmesi gerekmektedir. Gıda katkı maddelerinin kullanım izinlerinin verilmesinde ilk basamak, kullanıma sunulacak olan kimyasalın deney hayvanlarında hangi miktarlarda hangi etkileri göstereceğinin saptanmasıdır. Bu amaçla genellikle fare, rat, kobay gibi deney hayvanları kullanılmaktadır. Kimyasalın etkisini belirlemek amacıyla öncelikle bu maddenin yüksek konsantrasyonlar da dâhil olmak üzere çeşitli dozları oral, intraperitoneal veya buna benzer yollarla deneklere verilerek muhtemel tüm toksik etkileri araştırılır. Tüm toksisite testlerinde bir kimyasal madde için ortalama 3000 civarında deney hayvanı kullanılır. Bu testler uluslararası kuruluşların belirlediği iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) kurallarına göre çalışan laboratuvarlarda yapılır. Çalışmalarda kullanılan testler aşağıdaki gibidir [Saygı, 2003; Sarıkaya, 2005].

A. Toksikokinetik Çalışmalar: İncelenen katkı maddesinin organizmada emilimi, dağılımı, biyotransformasyonu ve atılımı incelenir.

B. Toksisite Testleri:

1. Akut Toksisite Testi: En az üç doz ve tek seferde uygulanan ve 1, 2, 24, 48, 72 ve 96 saat gibi kısa süreler içinde uygulanan testlerdir.
2. Subakut Toksisite Testi: Kimyasal madde deney hayvanlarına her gün bir veya daha fazla tekrarlanan şekilde verilir. Test süresi 1-3 haftadır.
3. Subkronik Toksisite Testi: Sıçan ve köpek gibi deney hayvanlarının seçildiği bu testte deney süresi 3 aydır.
4. Kronik Toksisite Testi: Uzun dönemde kimyasal madde maruziyetinin neden olabileceği toksik etkilerin saptanması için dizayn edilen toksisite testidir.

Deneysel kronik toksisite testi süresi deneyde kullanılan hayvanın tüm ömrünce, örneğin bu süre sıçanlarda yaklaşık 2 yıl, köpeklerde ise 5-7 yıl kadar olabilir.

5. Mutajenik etki: DNA üzerinde kalıcı değişikliklerdir.
6. Karsinojenik etki: Kansere yapıcı etkidir.
7. Teratojenik etki: Sakat yavru doğumlarına yol açan etkidir.
8. Transplasental Karsinojenik etki: Gebenin yavrusunda doğumdan yıllar sonra kanser oluşumudur.
9. İmmünotoksik etki: İmmün sistem üzerinde toksik etkidir.
10. Fertilite testi: Üreme yeteneği üzerine etkidir.
11. Nörotoksik etki: Sinir sistemi üzerine toksik etkidir.

Toksisite test sonuçları uluslararası/ulusal kuruluşlarca oluşturulan bilimsel komitelerce değerlendirilerek güvenli kullanım için gerekli sayısal değerlere ulaşılır [Sarıkaya, 2005]. Çalışmalar sonunda katkı maddesinin hiçbir etkisinin bulunmadığı bir doz elde edilmezse, bu maddenin kullanımına izin verilmez. Eğer deney hayvanına hiçbir etki göstermeyen bir doz elde edilirse, bu doz etkisiz doz veya NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) olarak tanımlanır.

Besinlere katılacak katkı maddesinin maksimum miktarlarının belirlenmesi için katkı maddesinin ADI (Acceptable Daily Intake) yani günlük alınabilecek miktarının belirlenmesi gereklidir. Katkı maddesinin ADI değeri toksikolojik testlerle belirlenir. Deney hayvanlarına belirli dozlarda katkı maddesi verilerek bunların metabolizması, atılımı ve emilimi incelenir [WHO, 2001]. Deney insanlar üzerinde uygulanamayacağından, güvenlik faktörü olarak isimlendirilen bir faktör kullanılır. Güvenlik faktörü genellikle 100'dür. Yani deney hayvanında hiçbir etki göstermeyen dozun 1/100'ü insan için kabul edilir. Böylece günlük alınabilecek miktar (ADI) insanın vücut ağırlığının kilogramı başına mg olarak belirlenir. Günlük maksimum alım= ADI X Vücut ağırlığı [WHO, 2001].

2.2.1. Gıda Katkı Maddelerinin Güvenli Kullanımı İçin Çalışan Uluslararası Kuruluşlar

1. CAC (Codex Alimentarius Commission): Birleşmiş milletlere bağlı olarak çalışan bir kuruluştur. Kuruluşun görevi, dünyada gıda ile ilgili uygulamaların teknoloji ve sağlık açısından standardize edilmesidir.
2. JECFA (The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives): 1956 yılından bu yana katkı maddelerinin insan sağlığı yönünden değerlendirilmesi için toplanan FAO/WHO ortak uzmanlar komitelerine verilen isimdir. Bu komiteler, gıda katkı maddeleri için tüm bilimsel verileri inceleyerek değerlendirmeler yapmakta ve ADI değerlerini tespit etmektedir.
3. JMPR (The Joint FAO/WHO Meeting on Pesticides Residues): Bu kuruluş gıda ürünlerindeki pestisit kalıntılarını değerlendiren ve gıdalarda günlük alımda insan sağlığına zarar vermeyecek maksimum pestisit miktarlarını belirleyen bir kuruluştur.
4. SCF (Eu-Scientific Committee on Food): Avrupa Birliği'nin gıdalarla ilgili toksikoloji, hijyen ve beslenme konularında yetkili olan komitesidir.
5. FDA (Food and Drug Administration): Yukarıda bahsedilen kuruluşlar arasında en eski tarihe sahip olan kuruluştur. ABD'nin ulusal kuruluşu olsa da tüm dünyada referans olarak gösterilen bir kurumdur [Sarıkaya, 2005; Karaali, 1994].

2.3. Antioksidan Gıda Katkı Maddeleri

Antioksidan maddeler uzun ömürlü gıdalarda oksitlenmeyi engelleyerek gıdaların daha uzun ömürlü olmasını sağlayan maddelerdir. Serbest radikal oluşumunu engelleyerek oksidasyon reaksiyonlarını inhibe ederler. Serbest radikaller, aminoasitlerin oksidasyonu yanında, peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağlarının oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Bunun sonucunda enzimler fonksiyon kaybına uğrayabilirler ve böylece gıdalarda bozulmalara yol açabilirler [Gürsoy, 2001]. Antioksidan maddelere örnek olarak sitrik asit, fosforik asit, butillendirilmiş hidroksi anisol, butillendirilmiş hidroksi toluen verilebilir.

2.4. Sitrik Asit (E-330)

Sitrik asit, bitki ve hayvanların bilinen metabolitleri arasında yer alır. İlk olarak limon suyundan izole edilmiş daha sonra birçok organizmanın fermentasyonla bu asidi ürettiği belirlenmiştir. Endüstriyel olarak kullanımına da 1860 yılında İtalya’da başlanmıştır. 1893 yılında *Penicillium mold* türü mantarın şekerden sitrik asit ürettiği tespit edilmiştir. Yine 1917 yılında *Aspergillus niger*’in de hızlı ve verimli bir sitrik asit üreticisi olduğu belirlenmiştir [Elmacı, 2001]. Bu madde, ticari olarak kolayca elde edilmesi ve ekonomik olarak uygun olması nedeniyle gıdalarda sıklıkla kullanılır. Gıdalara asitleştirme, pH düzenleyicisi, nadiren renk verici olarak katılmaktadır. Bu madde meşrubatlarda, şekerli gıdalarda, konservelerde kullanılmasının yanı sıra, kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır. Sitrik asidin Türk Gıda Kodeksi’nde hangi gıdalarda ne kadar kullanılacağını belirten göstergeleri Çizelge 2.1’deki gibidir.

Çizelge 2.1. Sitrik asitin gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri

Gıda Maddesi	En yüksek Miktar
Kakao ve kakao ürünleri ile Çikolata ve Çikolata ürünleri Tebliği’nde yer alan ürünler	% 0,5
Şaraplar	1 g/l
Meyve Suları	3 g/l
Nektarlar	5 g/l

Sitrik asit, bitki ve hayvan hücrelerinin yapısında doğal olarak bulunan zayıf organik bir asittir. Organizmada sitrik asit döngüsü olarak da isimlendirilen (Krebs döngüsü, trikarboksilik asit döngüsü) döngü ile oluşur. Sitrik asit döngüsünde karbohidratlar, yağ asitleri ve aminoasitler gibi enerji bakımından zengin moleküller oksidasyona uğrar. Dairesel bir yol izleyen ve oksijenli ortamda gerçekleşen bu döngünün ilk basamağında asetil-CoA ve oksaloasetik asitten sitrik asit sentezi gerçekleştirilir. Sitrik asit döngüsü ile organizma için gerekli olan enerji yani ATP sentezlenir

[Gözükara, 1989; Koçak, 2005]. Bu madde için bazı LD₅₀ değerleri Çizelge 2.2’de verilmiştir [Gürsoy, 2001].

Çizelge 2.2. Sitrik asitin çeşitli canlı gruplarında bazı LD₅₀ değerleri

Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri
Rat	Oral	11700 mg/kg
Rat	İntraperitonal	883 mg/kg
Rat	Subkutan	5500 mg/kg
Fare	Oral	5040 mg/kg
Fare	İntraperitonal	961 mg/kg
Fare	Subkutan	2700 mg/kg
Fare	İntravenöz	42 mg/kg
Tavşan	Oral	7000 mg/kg
Tavşan	İntravenöz	330 mg/kg

Gıdalarda oldukça sıklıkla kullanılan bu maddenin genotoksik etkileri ile ilgili olarak çok fazla çalışma yapılmamıştır. Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmaların bazıları şu şekildedir. 1984 yılında Japonya’da yapılan bir çalışmada sitrik asit de dâhil olmak üzere toplam 347 sentetik katkı maddesinin *Salmonella*/mikrozom testi ve *in vitro* Çin hamsteri fibroblast hücreleri kullanılarak genotoksisitesi belirlenmeye çalışılmıştır. Sitrik asit her iki testte de herhangi bir etki göstermemiştir [Ishidate ve ark., 1984].

Aktaç ve ark. (2003) yaptıkları bir çalışmada sitrik asidin fare karaciğeri üzerine toksik etkilerini incelemişlerdir. 10 gün süre ile bu maddelerin uygulanmasıyla tüm deney gruplarında karaciğerde kromatin yıkımı, vakuollü ve camı sitoplâzmalı hepatositler, hepatositler içerisinde kollajen fiberlerinde artış şeklinde nekrotik değişikliklere rastlamışlardır. Yine urikaz aktivitesi kontrole göre tüm gruplarda artarken, katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artışa rastlamamışlardır [Aktaç ve ark., 2003].

Koçak (2005), sitrik asitin *in vivo* genotoksik etkisini *Tinca tinca* (L., 1758) (Pisces: Cyprinidae) eritrositlerinde mikronükleus testi ile araştırmıştır. Araştırmacı sitrik asidin 200, 300 ve 400 µg/ml'lik dozlarını kullanmış ve uygulama gruplarının tamamında MN oluşumunun kontrole göre önemli oranda arttığını belirlemiştir [Koçak, 2005].

Türkoğlu (2007), sitrik asidin *A. cepa*'da mitotik indeksi kontrole göre anlamlı oranda düşürdüğünü, ayrıca 5 saatlik uygulamadan sonra metafaz safhasında artış olduğunu, 10 ve 20 saatlik uygulamalarda anafaz ve telofaz safhalarında düşüş olduğunu belirtmiştir. Ayrıca sitrik asidin anafazda köprüler, c-mitoz, kalgın kromozomlar ve yapışıklığa sebep olduğunu göstermiştir. Tüm uygulama gruplarında sitrik asidin kromozomal anormalliklerde kontrole göre anlamlı oranda artışa neden olduğunu göstermiştir [Türkoğlu, 2007]. Yukarıda belirtilen çalışmalar dışında, sitrik asitin insan lenfositlerinde genotoksitesisi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır

2.5. Fosforik Asit (E-338)

Fosforik asit, fosfor grubu içeren inorganik bir asittir. Gıdalarda asitleştirici, emülsifiyer, şelatör, tampon olarak pişirilmiş yiyeceklerde, kolalı içeceklerde, peynirde, pişirilmiş uzun ömürlü etlerde, alkol içermeyen aromalı içeceklerde sıklıkla kullanılmaktadır. Fosforik asit vücutta özellikle kemik ve dişlerin yapısına katılması nedeniyle önemli bir maddedir. Yine karbohidrat, yağ ve proteinlerin birçok metabolik işlemlerinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Bununla birlikte vücutta aşırı miktarda fosforik asit bulunması, kalsiyum eksikliğine ve dolayısıyla zayıf diş ve kemik yapısının ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Fosforik asitin Türk Gıda Kodeksi'nde hangi gıdalarda ne kadar kullanılacağını belirten göstergeleri Çizelge 2.3'deki gibidir.

Çizelge 2.3. Fosforik asitin gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri

Gıda Maddesi	En yüksek Miktar
Alkol içermeyen aromalı içecekler	700 mg/L
Ek besinler	1 g/kg

Fosforik asitin karsinojenik, nörotoksik etkileriyle ilgili olarak bir bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte genotoksisite çalışmaları da oldukça az ve sadece bakterilerle sınırlıdır. Fosforik asit *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA104 suşlarında ve *Escherichia coli*'de herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir [Dose, 1994]. Yukarıda belirtilen çalışmalar dışında, benzoik asitin insan lenfositlerinde genotoksisitesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Uzun ömürlü gıdalarda sıklıkla kullanılan bu madde için bazı LD₅₀ değerleri Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Fosforik asitin çeşitli canlı gruplarında bazı LD₅₀ değerleri

Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri
Rat	Oral	1530 mg/kg
Fare	Oral	1250 mg/kg
Tavşan	Deri	2740 mg/kg

2.6. Antimikrobiyal Gıda Katkı Maddeleri

Antimikrobiyal katkı maddeleri, gıdalarda bulunabilecek mikroorganizmaların hücre zarı, hücre duvarı, gen yapısı, protein yapısı ya da enzim sistemlerini etkileyerek durdurucu veya öldürücü özelliğe sahip olan maddelerdir [Ekşi, 1989]. Gıdalara eklenen antimikrobiyal maddeler tat ve kokuyu korurken, yağ ve benzeri maddelerin acılaşmasını engeller. En önemli görevleri besinleri mikroorganizmalardan korumaktır [Saldamh, 1985]. Antimikrobiyal maddeler yukarıda bahsedilen olumlu etkilerinin yanı sıra, çeşitli şekillerde sağlığı olumsuz yönde de etkileyebilirler, bu nedenle en yüksek kullanım sınırlarının üzerinde kullanılmaması gerekli olan

maddelerdir. Yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal maddelere örnek olarak benzoik asit, kalsiyum propiyonat, sodyum nitrat, sodyum nitrit, sorbik asit, kalsiyum asetat verilebilir.

2.7. Benzoik Asit (E-210)

Benzoik asit, toluenin likid faz oksidasyonu ile elde edilmektedir. Benzoik asit ve tuzları katkı maddesi olarak gıdalarda, bunun yanı sıra kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır. Yıllık benzoik asit üretiminin 638.000 ton olduğu belirtilmektedir. Benzoik asit, birçok bitki ve hayvanda doğal olarak bulunan bir maddedir. Özellikle süt ve süt ürünlerinde çokça bulunmaktadır. Kirazda yaklaşık % 0.05 oranında, birçok *Vaccinium* türlerinin olgun meyvası (örneğin kıvılcık) 300-1300 mg oranında serbest benzoik asit içermektedir. Yine *Nectria galligena* mantarı ile infekte olmuş elmada da gözlemlenmektedir. Hayvanlarda da ilk olarak omnivorlar veya herbivorlarda (örneğin *Lagopus mutus*, *Ovibos moschatus* ve *Elephas maximus*'da tespit edilmiştir [Wilson ve ark. 2004]. Diğer yandan memelilerde idrarda hippurik asidin bir parçası olarak bulunur [WHO, 2000]. Bu madde aromalı içeceklerde, alkollü içeceklerde, soslarda ve diğer birçok gıdada yoğun olarak kullanılmaktadır. Gıdalarda özellikle asitleştirme amacıyla kullanılmaktadır. Benzoik asitin Türk Gıda Kodeksi'nde hangi gıdalarda ne kadar kullanılacağını belirten göstergeleri Çizelge 2.5'deki gibidir.

Çizelge 2.5. Benzoik asitin gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri

Gıda Maddesi	En yüksek Miktar
Aromalı içecekler	150 µg/mL
Alkollü içecekler	200-500 µg/mL
Soslar	1000 µg/mL
Pişmiş kırmızı pancar	2000 µg/mL

Tohda ve ark. (1980), benzoik asitin insan lymphoblastoid hücrelerinde 30 mM'lık konsantrasyonda [Tohda ve ark., 1980], yine Zeiger ve ark. (1988) S.

typhimurium'un TA97, 98, 100, 1535 ve 1537'lik suşlarında 5000 µg/petri üzerinde sitotoksik etkili olduğunu belirtmişlerdir [Zeiger ve ark., 1988].

Ishidate ve arkadaşları (1984), benzoik asitin genotoksik etkilerini *Salmonella*/mikrozom testi ve *in vitro* Çin hamsteri fibroblast hücreleri kullanılarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar benzoik asitin her iki testte de zayıf genotoksik etkili bir madde olduğunu belirtmişlerdir [Ishidate ve ark., 1984].

Sasaki ve arkadaşları (2002), benzoik asit ve tuzlarının genotoksik etkilerini 8 farklı fare organında (mide, idrar kesesi, beyin, karaciğer, böbrek, akciğer, kolon, kemik iliği) komet test yöntemiyle araştırmışlardır. Araştırmacılar benzoik asit ve tuzlarının çalışılan fare organlarında DNA hasarına neden olmadığını belirlemişlerdir [Sasaki ve ark., 2002].

Aktaş ve ark. (2003), benzoik asitin fare karaciğerinde tüm deney gruplarında nekrotik değişikliklere neden olduğunu belirlemişlerdir. Bu değişiklikler kromatin yıkımı, vakuollü ve camsı sitoplazmalı hepatositler, hepatositler içerisinde kollagen fiberlerinde artış şeklinde gerçekleşmiştir. Urikaz aktivitesi kontrole göre tüm gruplarda artarken, katalaz aktivitesinde istatistiksel olarak önemli bir artışa rastlamamışlardır [Aktaş ve ark., 2003].

Sarıkaya ve Solak (2003), benzoik asidin 50, 75 ve 100 mM'lık dozlarını kullanarak *Drosophila*'da SMART testi ile etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar, benzoik asitin *Drosophila*'da mutasyonlarda artışa neden olduğunu, ayrıca yaşam süresi üzerinde de önemli oranda etkili olduğu ve kontrole göre yaşam süresini kısalttığını bildirmişlerdir [Sarıkaya ve Solak, 2003].

Yukarıda belirtilen çalışmalar dışında, benzoik asitin insan lenfositlerinde genotoksitesitesi ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Gıdalarda sıklıkla kullanılan bu madde için bazı LD₅₀ değerleri Çizelge 2.6'daki gibidir.

Çizelge 2.6. Benzoik asitin çeşitli canlı gruplarında bazı LD₅₀ değerleri

Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri
Rat	Oral	1700-2530 mg/kg
Fare	Oral	1736-2370 mg/kg

2.8. Kalsiyum Propiyonat (E-282)

Uzun ömürlü ekmeklerde antimikrobiyal bir madde olarak kullanılmaktadır. Ekmek hamuruna un ağırlığı üzerinden yaklaşık olarak % 0,1-0,3 oranında katılabilmektedir. Propiyonat, küfleri inhibe ettiği ve mayalara etki etmediği için bir anti-rop ajanı olarak uygun görülmektedir. Fırınlanmış gıdalarda hem sodyum hem de kalsiyum propiyonat kullanılabilen, ancak ekmekte bir zenginleştirici olmasından dolayı kalsiyum propiyonat tercih edilmektedir [Göçmen, 2001]. Kalsiyum propiyonatın Türk Gıda Kodeksi'nde hangi gıdalarda ne kadar kullanılacağını belirten göstergeleri Çizelge 2.7'deki gibidir.

Çizelge 2.7. Kalsiyum propiyonatın gıdalarda kullanımına izin verilen değerleri

Gıda Maddesi	En yüksek Miktar
Ambalajlı dilimli ekmek ve çavdar ekmeği	3000 mg/kg
Enerjisi azaltılmış ekmek	2000 mg/kg
Kısmen fırınlanmış ambalajlı ekmek	2000 mg/kg
Ambalajlı ekmek çeşitleri	2000 mg/kg

Kalsiyum propiyonatın karsinojenik, teratojenik ve nörotoksik etkileri ile ilgili çalışmalar bulunmamaktadır. Genotoksisitesi ile ilgili olarak yapılan birkaç çalışma bulunmaktadır. Kalsiyum propiyonat *Bacillus subtilis* rekombinasyon testi, *E. coli* ve *S. typhimurium* reversion testinde herhangi bir mutajenik etki göstermemiştir [Ohta ve ark. 1980]. Yapılan başka bir çalışmada kalsiyum propiyonatın AMES testinde negatif etkili olduğu ancak Çin hamsteri akciğer hücrelerinde kromozomal

anormalliklere neden olduğu belirlenmiştir [Ishidate ve ark., 1984]. Türkoğlu (2008), kalsiyum propiyonatın *A. cepa* kromozomlarında kromozomal anormallik frekansını kontrole göre önemli oranda artırdığını, mitotik indeksi de önemli oranda düşürdüğünü belirtmiştir [Türkoğlu, 2008]. Kalsiyum propiyonatın insan lenfositlerinde genotoksik etkileri ile ilgili herhangi bir çalışma yoktur. Çoğunlukla uzun ömürlü ekmeklerde kullanılan bu madde için bazı LD₅₀ değerleri Çizelge 2.8'deki gibidir.

Çizelge 2.8. Kalsiyum propiyonatın çeşitli canlı gruplarında bazı LD₅₀ değerleri

Canlı türü	Uygulama Şekli	LD ₅₀ değeri
Rat	Oral	3920 mg/kg
Fare	Oral	2350 mg/kg

2.9. Mutajenite Testleri

Son yıllarda dünya nüfusunun hızla artması nedeniyle gıda maddeleri gereksinimi de artmıştır. Gıda endüstrisindeki çok hızlı gelişim sonucunda günlük yaşantımıza giren birçok yeni kimyasal maddenin karsinojenik risklerini ortaya çıkarmak için en akılcı yaklaşım, deney hayvanlarında tümör oluşumudur. Bu testlerde, kimyasal maddenin uygulanmasıyla, deney sonuçlarının alınması arasında geçen sürenin çok uzun olmasından ötürü, bunlara uzun süreli testler adı verilmiştir. Uzun süreli testler maliyet açısından oldukça pahalıdır. Bu nedenle araştırmacılar, karsinojenite ile ilgili olarak bilgi verecek, kısa zamanda sonuç veren ve düşük maliyetli testler geliştirmişlerdir. Bu testler, kimyasalların mutajenik etkilerini belirlemeye yöneliktir [Akın, 1990; Sarıkaya, 2005]

Çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik, mutajenik, sitotoksik etkilerinin araştırılmasında değişik canlı gruplarını kapsayan çeşitli metodlar kullanılmaktadır. Bu testlerde bakteriler, mayalar, bitkiler, hayvanlar ve insan hücre kültürleri kullanılmaktadır. Bakterilerle yapılan testler arasında en iyi bilineni ve en fazla kullanılanı Ames testidir. *Salmonella typhimurium* kullanılarak yapılan bu yöntem, genotoksik ve karsinojenik etkinin araştırılmasında birçok kimyasal madde için

uygulanmaktadır. Bakteriyel uygulama, fazla masraflı olmaması ve kimyasalların çok farklı dozlarının uygulanabilmesi nedeniyle tercih edilen bir test metodudur [Çelik, 2003]. Ayrıca *Salmonella* mutasyon testi, kimyasalların potansiyel karsinogen olup olmadıklarını kısa sürede ortaya koyan özgün bir metot olarak tanımlanmaktadır [Johnson, 2003].

Mayalar, ökaryot oldukları ve yüksek yapıli organizmaların hücre yapılarına benzerlik gösterdikleri için çok fazla kullanılan gruptan birisidir. *Saccharomyces cerevisiae* ve *Saccharomyces pombe* en fazla kullanılan türlerdir. pH değişimlerini ve sıcaklık değişimlerini tolere edebilecek şekilde fizyolojik açıdan dayanıklı organizmalardır. Genotoksisite çalışmalarında *Saccharomyces cerevisiae* soylarının hem haploid hem de diploit formları kullanılabilirken, *Saccharomyces pombe* soylarının sadece haploitlerinde gen mutasyonları için genotoksisite çalışmaları yapılabilir [Çelik, 2003].

Genotoksik etkinin belirlenmesinde kullanılan kısa süreli test yöntemlerinden birisi de *Allium* testidir. *Allium* test hızlı, hassas ve yenilenebilir özelliklere sahip olması nedeniyle sıkça kullanılan bir testtir. *Allium* testinde, *Allium cepa*, *Allium sativum* ve *Vicia faba* yaygın olarak kullanılan yüksek yapıli bitkilerdir. *Allium* testi, ilk olarak 1938’de Levan tarafından kullanılmış daha sonra Fiskesjö tarafından çeşitli kimyasalların toksisitesinin belirlenmesinde standart bir metod olarak önerilmiştir [Fiskesjö, 1985; Rank ve Nielsen, 1993]. Bitkiler kolay ve ucuz elde edilmesi, kromozomlarının genellikle büyük ve az sayıda olması nedeniyle toksisite çalışmalarında tercih edilmektedir.

Drosophila’nın kullanıldığı mutajenite testlerinde, toksisite testi, sterilité testi, Basc (Muller-5) testi gibi çeşitli metodlar geliştirilmiştir. *Drosophila*’da en çok kullanılan test, eşeye bağıli letalite testidir. Bu testte üreme hücrelerinde görülen mutasyonlar incelenmektedir. *In vivo* mutajenite testleri için rat, fare, hamster gibi memeli hayvanlar kullanılarak, kimyasalların etkileri araştırılmaktadır [Çelik, 2003].

2.9.1. Kromozom anormallikleri (KA) metodu

Sıkça kullanılan testlerden biridir. Kültüre alınmış periferik kan lenfositlerinde kromozomal anormallik frekansının belirlenmesi esasına dayanır. Mesleki olarak ya da çevresel olarak, bilinen ya da şüphelenilen genotoksik maddelere maruziyeti ya da maruziyetin biyolojik etkilerini değerlendirmede en fazla kullanılan yöntemdir. Genetik hasarın boyutunu saptar. Yapısal değişimler, kromozomal anormallik tekniği kullanılarak, mitotik metafaz kromozomlarında değerlendirilir [Çakmak, 2000]. Kromozom aberasyonları uzun zamandan beri, genotoksik maddelere maruz kalan insanların, bu maddelerden nasıl etkilendiklerinin sağlam bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. İnsan popülasyonları üzerine yapılan çalışmalar, periferik lenfositlerdeki spontan kromozom anormalliklerinin frekansı ile kanser oluşumu arasında doğru orantı (pozitif korelasyon) olduğunu ortaya koymaktadır [Natarajan, 2002; Bolognesi, 2003; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006; Yılmaz ve ark., 2008]. Kullanılan fiziksel veya kimyasal ajanların etkisine göre kromozom kırığı, kromatid kırığı, fragment, disentrik kromozom, kardeş kromatidlerde birleşme (sister union), halka kromozom, kromatidlerde değişim (triradial, quadriradial şekiller), gap, kromozom kontraksiyonu, poliploidi, endoreduplikasyon, translokasyon, inversiyon gibi kromozom aberasyonları meydana gelebilir [Çakmak, 2000; Çelik, 2003]. Yakın kromozomlardaki basit kırıklarda, kırık uçlar tekrar birleşebilmekte ve ortaya yeniden düzenlenmiş kromozomlar çıkmaktadır. Bu olay onarılma şeklinde ya da disentrik kromozomlar, translokasyonlar, ters dönmeler (inversiyon) biçiminde olabilmektedir. Daha karmaşık düzenlemeler ise halka (ring) şeklinde ortaya çıkabilmektedir. Asentrik fragmentlerin oluşumu ise kromozomlardaki basit kırıklar sonucudur. Kromatid açıklığı olan gap ise kromatid kolundaki boyanmamış açıklıklar olarak bilinir, bunlar kromatid koluyla aynı uzantıdadır ve kromatid koluyla arasındaki uzaklık kol kalınlığına eşit ya da daha küçüktür [Çakmak, 2000].

2.9.2. Kardeş kromatit değişimi (KKD) (Sister Chromatid Exchange-SCE) metodu

Kimyasal mutajenlerin ve karsinojenlerin genotoksik etkilerinin araştırılmasında kullanılan sitogenetik uygulamalardan biri de kardeş kromatit değişimi (KKD) metodudur. Kardeş kromatit değişimi ilk olarak Taylor'un 1958 yılında bitki hücrelerinde yapmış olduğu çalışmalarla gözlemlenebilmiştir [Taylor, 1958]. Kromozomların işaretli timin varlığında 1. mitozda bir defa kendilerini eşlemelerine izin verilmiş, ikinci replikasyonda ise ortamda izotop bulunmadan kendilerini eşlemeleri beklenmiş, daha sonra otoradyografide DNA'nın semikonservatif eşlenmesi sonucunda, her kromozoma ait sadece bir kromatidin işaretlendiği gözlenmiştir. İşaretleme sonucu oluşan kardeş kromatidler arasında özdeş segmentlerin simetrik değişimi ilk kez Taylor tarafından kardeş kromatit değişimi olarak tanımlanmıştır [Çelik, 2003]. Daha sonraları KKD'lerdeki kırıkları görünür hale getirmek için, DNA'da timin analogu gibi davranan 5-Bromodeoxyuridine (BrdU)'nin hücre döngüsü sırasında kardeş kromatidlerin arasına girmesi sağlanmıştır, ardından flörsan ışık altında ışınlanıp Giemsa ile boyanarak görünür hale getirilmiştir [Natarajan, 2002]. BrdU, deoksitimin (dT) ve deoksiuridin (dU) birbirlerinin analogu olan maddelerdir. BrdU, dT ve dU arasındaki tek fark, taşıdıkları benzen halkasındaki 5. karbon atomuna dT'de CH₃ (metil), dU'de H (hidrojen) atomu ve BrdU'de Br (brom) atomunun bağlı olmasıdır. DNA replikasyonu sırasında eğer ortamda BrdU varsa, DNA'nın semikonservatif sentez mekanizmasına göre, sentezlenen yeni polinükleotid zincirinde timinin yerini BrdU alacaktır. DNA içine yerleşmiş olan BrdU, uv lambası ile ışınlanmaya maruz bırakıldığında, boyama sonucunda bu bölgelerin daha açık renkli gözlenmesini sağlar [Topaktaş ve Rencüzoğulları, 1995]. Bu boyanma farkı, DNA'da kardeş kromatidler arasında oluşan değişimleri göstermektedir. KKD yöntemi, DNA hasarlarının belirlenmesinde hassas testlerden bir tanesidir [Palitti ve ark., 1982, Aksoy ve ark., 2006; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2008]. Kardeş kromatit değişimleri sadece flörsan ve gimsa ile değil aynı zamanda DAPI veya propidium iodid gibi flörsan ışığa gösteren boyalar ile de belirlenebilmektedir.

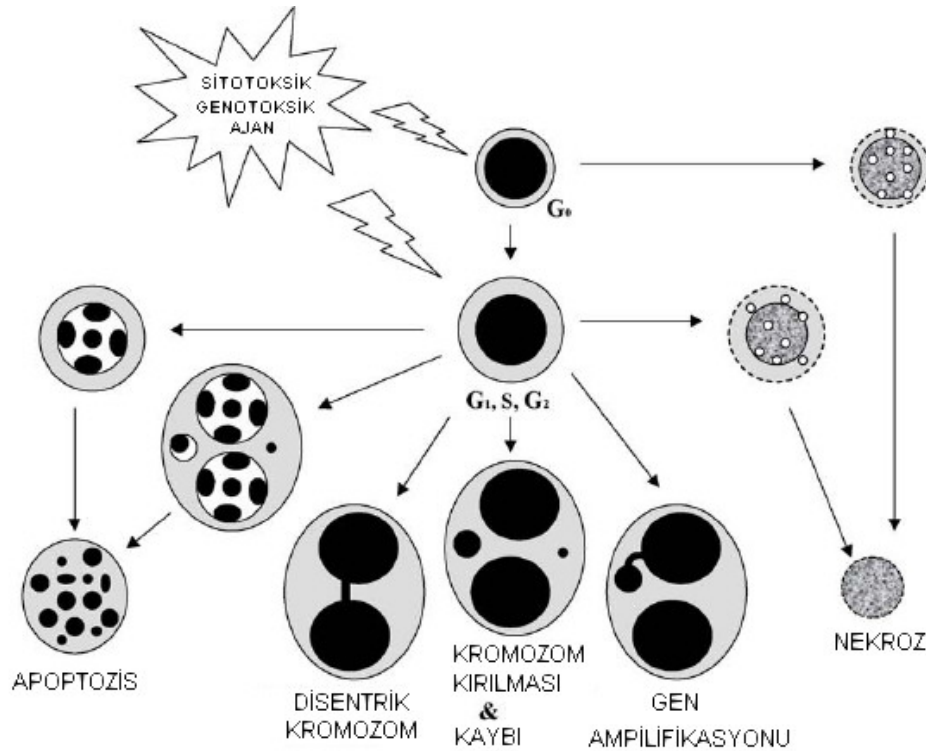
2.9.3. Mikronükleus metodu

Çeşitli kimyasal ve fiziksel ajanların klastojenik ve aneugenik etkilerini belirlemek için kullanılan yöntemlerden birisi de, sitokinezi bloklanmış hücrede mikronükleus (Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay=CBMN Assay) metodudur. Mikronükleus (MN) yöntemi ilk olarak 1886 yılında anemik kedilerin kırmızı kan hücrelerinde Howell'ın gözlemleriyle ortaya çıkmıştır. 1907'de Jolly, mikronükleusların varlığını doğrulamıştır. Bu yüzden mikronükleuslar, hematolojide Howell-Jolly cisimleri olarak bilinirler [Çakmak, 2000]. 1950'lerde bitki hücrelerinde kromozom hasarının ölçülmesinde, 1970'lerde hayvan hücrelerinde ve daha sonra 1976 yılında Haddle ve arkadaşları tarafından kültüre edilmiş insan lenfositlerinde kimyasal kanserojenleri belirlemeye yönelik bir test olarak kullanılmaya başlanmıştır [Çakmak, 2000; Demirel ve Zamani, 2002]. Yöntemin kabul görmesi yavaş olmuştur, çünkü değerlendirmeye alınan hücrelerin bölünme geçirip geçirmediğini saptamak güçtür. 1985'de Fenech ve Morley tarafından mikronükleus yönteminde, sitokinezi durdurmak üzere sitokalsin B (Cyt B) adlı kimyasalın kullanılmasıyla ilk bölünmesini geçirmiş mitotik hücrelerin binükleer görüntülerinin tanınabilmesi bu zorluğun üstesinden gelinmesini sağlamıştır [Fenech ve Morley, 1985]. 1993'de Migliore ve arkadaşları, *in vitro* çalışmalarda izole lenfositler yerine, tam kanın kültüre alınmasını, mikronükleus yönteminde daha iyi deneysel koşulları ve sonuçları sağlaması açısından önermiştir [Migliore ve ark., 1989].

Sitokinezin durdurulduğu mikronükleus yönteminde kullanılan Cyt B, aktin polimeraz inhibitörü olan bir maddedir. Bu özelliği ile nükleer bölünmeyi durdurmadan, mitotik sitokinezi yani sitoplazmanın bölünmesini durdurur. Cyt B etkisiyle, hücre çekirdeği bölünürken, sitoplazma bölünmesi (sitokinez) durur ve binükleer hücreler ortaya çıkar. Mikronükleuslar, spontan olarak ya da genotoksik ajanlara maruziyet sonucunda, asentrik kromozomal fragmentlerin ya da tüm kromozomların hücre bölünmesi sırasında, ana çekirdek dışında yavru çekirdek şeklinde kalmasından oluşmaktadır. Mitozun anafazında sentrik elementler kutuplara çekilirken, genotoksik ve/veya aneugenik etkiler sonucu ortaya çıkmış asentrik

elementler ve iğ ipliklerine bağlanamamış kromozomlar kutuplara çekilmeyerek, hücre bölünmesi sonunda aynı sitoplazma içinde, hücre çekirdeğinden ayrı olarak membranla çevrili bir yapı oluşturur (Şekil 2.1) [Çakmak, 2000].

Günümüzde mikronükleus metodu; genotoksisite ve sitotoksisite çalışmalarında; kromozom kırığı, kromozom kaybı, kromozomların farklı şekillenmesi (nükleoplasmik köprüler), hücre bölünmesinin inhibe edilmesi, gen amplifikasyonu, nekrosis ve apoptosisin basit morfolojik ölçütler kullanılarak değerlendirilmesini sağlar [Fenech, 2000 ve 2006].



Şekil 2.1. Sitotoksik ve genotoksik ajanların etkisiyle mikronükleus oluşumu, apoptozis ve nekroz [Fenech, 2006'dan]

2.9.4. Comet (Kuyruklu yıldız) (Single Cell Gel Electrophoresis) Metodu

DNA'da klastojenik etki ortaya çıkaran çeşitli kimyasal ajanların, bu etkilerini belirlemek için hızlı ve kolay test yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu geliştirilmeye çalışılan test tekniklerinden birisi de tek hücre jel elektroforezi veya

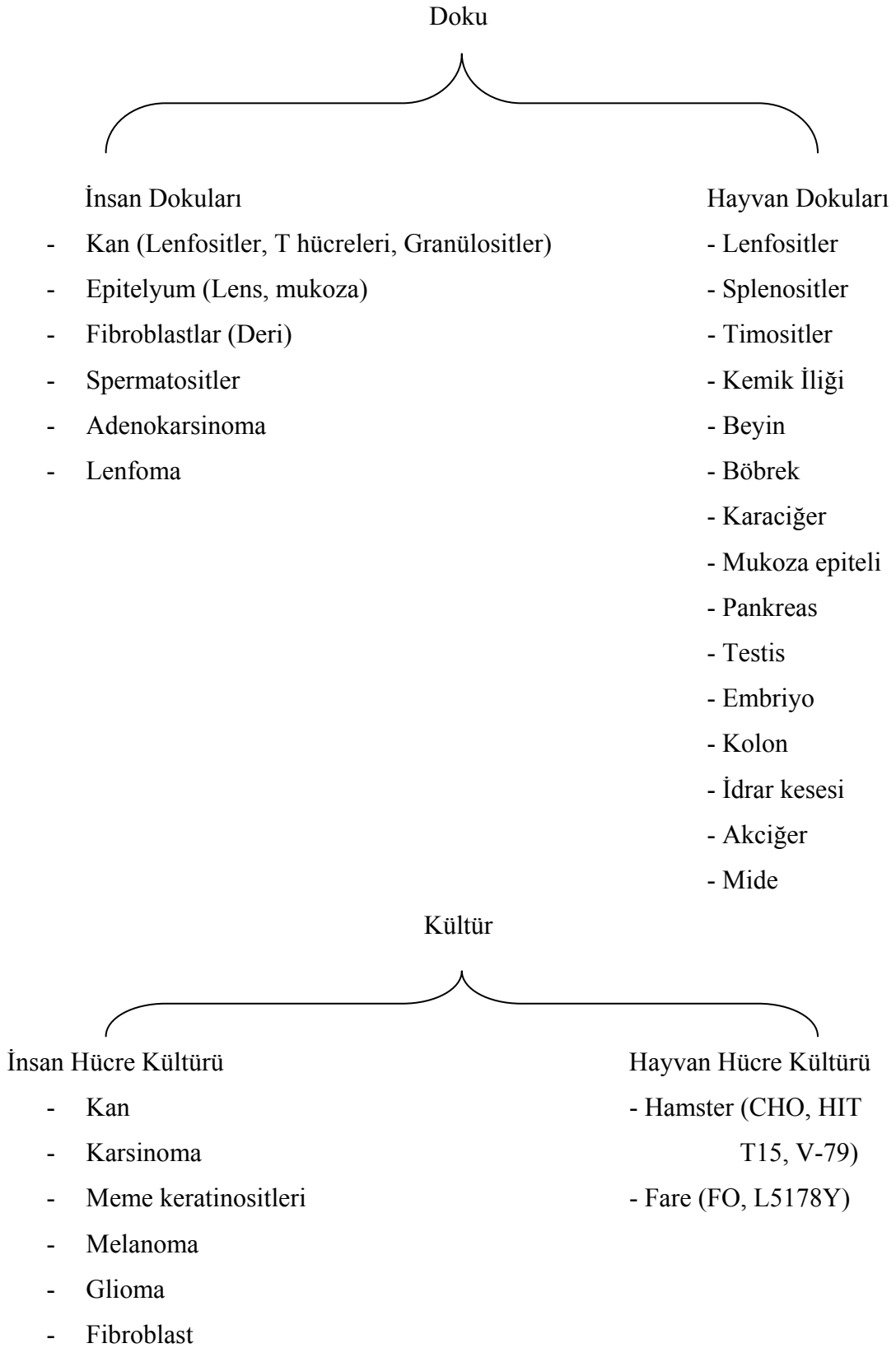
comet (kuyruklu yıldız) (Single cell gel electrophoresis=Microgel Electrophoresis Technique) testidir. Son yıllarda gelişen comet assay tekniği DNA hasarını ve tamirini belirlemek için hassas bir genotoksisite testidir [Singh ve ark., 1988; Fairbairn ve ark., 1995; Sasaki ve ark., 2002]. Bu teknik DNA tek zincir kırıklarını ve tamamlanmamış DNA tamir bölgelerini gösteren hassas, basit ve hızlı bir genotoksisite testi olarak kabul görmektedir [Ross ve ark. 1995; Tice ve Vazquez, 1998; Tice ve ark., 2000; Sasaki ve ark., 2002]. Genetik toksikolojide, apoptosis ve DNA tamiri çalışmalarında sıklıkla kullanılan bu yöntem ile hemen hemen tüm hücrelerde DNA hasarı direkt olarak belirlenebilmektedir.

Canlı hücrelerde DNA tek sarmal kırılmalarının tespiti ilk kez Rygberg ve Johanson (1978) tarafından gerçekleştirilmiştir. DNA'nın ayrılmasına izin veren hafif alkali şartlar altında, lam üzerindeki agarozda gömülmüş olan hücreleri lize ederek proteinlerinden ayırmışlardır. Daha sonra nötralize edip, akrinin oranj kullanarak DNA'yı boyamışlar ve kırmızı flöranla (tek sarmal) yeşilin (çift sarmal) oranını saptamışlardır. Fakat bu teknik çok yaygın olarak kullanılmamıştır [Ünal, 1998]. Bu nedenle nötral teknik 1984'te Ostling ve Johanson tarafından modifiye edilmiştir.

Ostling ve Johanson [1984], agarozla süspanse edilen hücreleri lam üzerine yayarak, yüksek tuz ve deterjanla lize etmişler ve ardından elektroforezise tabi tuttuktan sonra akrinin oranjla boyamışlardır. Eğer DNA kırık içeriyorsa, çekirdekten anoda doğru göç ederek kuyruklu yıldız görünümünü vermektedir. Bu nedenle hasarlı hücrelere comet yani kuyruklu yıldız adı verilmiştir. Fakat DNA çift sarmal kırıklarının tespitine izin veren nötral şartlar, tek sarmal kırıklarının belirlenmesine izin vermemektedir. Oysa, DNA'da hasar oluşturan çoğu ajan, DNA çift sarmalından çok, DNA tek sarmalında hasar meydana getirmektedir. Bunun yanında nötral şartlarda proteinler tam olarak uzaklaştırılamamaktadır. Bu nedenlerden dolayı, 1988'de Singh ve arkadaşları tarafından alkali şartlar altında DNA tek zincir kırıklarının tespitine izin veren teknik geliştirilmiştir. Kullanılan daha güçlü lizis koşulları, proteinlerin % 95'inden fazlasını çöktürebilmektedir [Ünal, 1998].

DNA'da meydana gelen kırılmaların artmasıyla, DNA parçaları comet kuyruğu içine göç etmektedir. Daha hasarlı olan apoptotik hücrelerde ise baş ve kuyruk tamamen dağılmış ve hedgehog (kirpi) olarak isimlendirilmiştir [Fairbairn ve ark., 1995]. Comet tekniğinin sonuçlarının değerlendirilmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Gelişmiş laboratuarlarda genellikle görüntü analizi programları kullanılmaktadır. Bunun yanında cometler hasarsız, az hasarlı, orta derecede hasarlı ve hasarlı şeklinde göz ile değerlendirilebilmektedir. Görüntü analizi yapılan laboratuarlarda kuyruk uzunluğu, kuyruk yoğunluğu ve kuyruk momenti (kuyruk uzunluğu ve kuyruk içindeki toplam DNA miktarının birbirine oranı) dikkate alınarak sonuçlar değerlendirilebilmektedir.

Comet tekniğinin farklı şekillerdeki uygulamaları sonuçları etkilemektedir. Örneğin elektroforez şartları (süre, voltaj), lysing solüsyonu şartları (tuz konsantrasyonu, süre, pH) metodun hassasiyetini etkileyebilmektedir. Bu nedenle deneyde şartlar standart tutulmak zorundadır. Bu tekniğin; az sayıda hücre gerektirmesi, değişik hücre ve dokulara uygulanabilmesi, hassas, hızlı ve güvenilir olması genotoksisite araştırmaları içerisinde oldukça fazla düzeyde kullanılmasına neden olmaktadır [Singh ve ark., 1988; Ünal, 1998; Tice ve ark., 2000].



Şekil 2.2. Comet Assay Tekniği Kullanılarak İncelenebilecek Hücre Tipleri [Ünal, 1998'den]

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kromozom incelemesi için materyal

Bu araştırmada sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın genotoksik etkilerini incelemek amacıyla insan periferik kan kültürü ve izole lenfositler kullanılmıştır. Her bir test materyali için kullanılacak olan periferik kan, sigara, alkol ve ilaç kullanmayan, herhangi bir sağlık problemi ve genotoksik ajanlara maruz kalma öyküsü olmayan 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek donörden temin edilmiştir.

3.1.2. Test Materyali

Test materyali olarak kullanılan maddelerden sitrik asit (Katalog No: 5949-29-1) Merck'den, benzoik asit (Katalog No: 65-85-0) ve fosforik asit (Katalog No:231-633-2) Sigma'dan, kalsiyum propiyonat (Katalog No: 4075-81-4) ise Fluka'dan temin edilmiştir.

Sitrik Asit

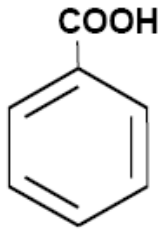
Sitrik asit (2-hidroksi-1,2,3 propan tri karboksilik asit) gıdalarda antioksidan asitleştirici olarak kullanılan zayıf organik bir asittir. Suda çözülebilir, yarı şeffaf, renksiz veya beyaz kristal tozlar halindedir. Molekül formülü $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ olup, moleküler ağırlığı 210,14 gr'dır.

Fosforik Asit

Fosforik asit gıdalarda antioksidan asitleştirici olarak kullanılan kuvvetli inorganik bir asittir. Suda çözülebilir sıvı bir asittir. Molekül formülü H_3PO_4 olup moleküler ağırlığı 97,9924 gr'dır

Benzoik Asit

Benzoik asit gıdalarda antimikrobiyal olarak kullanılan zayıf bir organik asittir. Katı beyaz kristal yapısında bir maddedir. Molekül formülü $C_7H_6O_2$ olup moleküler ağırlığı 122,13 gr'dır. Yapısal formülü aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.1. Benzoik asitin yapısal formülü

Kalsiyum Propiyonat

Kalsiyum propiyonat gıdalarda antimikrobiyal olarak kullanılan bir maddedir. Katı, beyaz kristal yapıda olan maddenin molekül formülü $C_6H_{10}CaO_4$, moleküler ağırlığı 186,22 gr'dır.

Çalışmada kullanılan diğer maddeler olan; Bromodeoksiüridin (Katalog No: 59-14-3), Mitomisin-C (Katalog No: 200-008-6), Kolkisin (Katalog No: 64-86-8), Sitokalsin-B (Katalog No: 14930-96-2), NaCl (Katalog No: 7647-14-5) Sigma'dan, EDTA (Katalog No: 6381-92-6), Tris (Katalog No: 77-86-1), NaOH (Katalog No: 1310-73-2), Triton X-100 (Katalog No: 9002-93-1), DMSO (Katalog No: 67-68-5), Düşük erime ısıllı agar (LMA) (Katalog No: 9012-36-6), Yüksek erime ısıllı agar (NMA) (Katalog No: 9012-36-6), EtBr (Katalog No: 1239-45-8), KCl (Katalog No: 7447-40-7) Applichem'den, Kromozom Medium B (Katalog No: F 5023), PBS (Katalog No: L 1825), Trypan Blue (Katalog No: L 6323) ve Biocoll (Katalog No: L 6115) Biochrom'dan alınmıştır.

3.2. Metot

3.2.1.Kültüre Alınmış İnsan Lenfositlerindeki Çalışmalar

Kromozom Anormalliği ve Kardeş Kromatid Değişimi Çalışmaları

Lenfosit kültürlerinin hazırlanmasında her bir katkı maddesi için ayrı ayrı sağlıklı, sigara içmeyen 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek bireyden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 mL periferik kan, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi ortamına (Kromozom Medium B) ekilmiştir. Bu ortama, daha önceden sartorius membran filtre ile steril edilerek hazırlanan BrdU (5-Bromo-2-deoksiuridin=Bromodeoksiüridin) solüsyonundan 10 µg/mL (mikrogram/mililitre) olacak şekilde ilave edilmiştir. Daha sonra kültür tüpleri, 37 °C'deki inkübatörde 72 saat inkübasyona alınmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 ve 48 saat sonra sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 µg/mL'lik, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/mL'lik, kalsiyum propiyonatın 50, 100, 200 ve 1000 µg/mL'lik, fosforik asitin 25, 50, 100, ve 200 µg/mL'lik, sitrik asit ve fosforik asit karışımının 25, 50, 100 ve 200 µg/mL'lik dozları ilave edilmiştir. Ayrıca her bir kimyasal için bir negatif kontrol bir de pozitif kontrol (MMC, 0,10 µg/mL) kullanılmıştır. İnkübasyon süresinin bitiminden 2 saat önce (kültürün 70. saatinde) her tüpe, 0,06 µg/mL olacak şekilde kolkisin solüsyonu ilave edilmiştir.

İnkübasyon süresinin bitiminde tüpler 1200 rpm'de (dakikadaki devir sayısı) 10 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan sıvı (süpernatant) atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 mL'lik kısmı vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Sonra bu tüplere, 37 °C'de bekletilen hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl), vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiştir. Tüpler 37 °C'deki etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, tüplere önceden buzdolabında soğutulan 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk fiksatif, vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiştir. Buzdolabında 45 dakika bekletilmiştir.

Bu tüpler 1200 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılmıştır. Fiksatifle yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır.

Son fiksatif işleminden sonra tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik beyaz kan hücrelerini içeren çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen bu süspansiyon, önceden 1 N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamalar üzerine 15-20 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılarak hücrelerin patlatılması ve kromozomların yayılmaları sağlanmıştır. Hazırlanan bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında ışık almayan ortamda kurumaya bırakılmışlardır.

Mikronükleus Çalışması

Mikronükleus çalışmasında, lenfosit kültürlerinin hazırlanmasında her bir katkı maddesi için ayrı ayrı sağlıklı, sigara içmeyen 24-25 yaşlarında bir bayan ve bir erkek bireyden alınan ve 1/10 oranında heparinize edilmiş 0,2 mL periferik kan, steril şartlarda 2,5 mL'lik besi ortamına (Kromozom Medium B) ekilmiştir. Daha sonra kültür tüpleri, 37°C'deki inkübatörde 72 saat inkübasyona alınmıştır. Kültür süresinin başlangıcından 24 saat sonra, sitrik asitin 50, 100, 200, 3000 µg/mL'lik, benzoik asitin 50, 100, 200, 500 µg/mL'lik, kalsiyum propiyonatın 50, 100, 200, 1000 µg/mL'lik, fosforik asitin 25, 50, 100, 200 µg/mL'lik, sitrik asit ve fosforik asit karışımının 25, 50, 100 ve 200 µg/mL'lik dozları ekilmiştir. İnkübasyonun 44. saatinde hücrelerin sitokinezini bloklamak amacıyla ortama sitokalsin B (5,2 µg/mL) ilave edilmiştir

İnkübasyon süresinin bitiminde tüpler 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır. Tüpün dibinde kalan ve hücreleri ihtiva eden 0,5-0,7 mL'lik kısmı vorteks yardımıyla iyice karıştırılarak homojen hale getirilmiştir. Sonra bu tüplere, 4°C'de bekletilen hipotonik solüsyondan (0,075 M KCl), vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiş ve tüpler 4°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atıldıktan sonra, tüplere önceden buzdolabında soğutulan 3:1 metanol:asetik asitten oluşan soğuk

fiksatif, vorteks üzerinde damla damla (5 mL) ilave edilmiş ve buzdolabında 10 dakika bekletilmiştir. Fiksatifle yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Üçüncü fiksatife sitoplâzmaların korunması amacıyla % 1'lik formaldehit ilave edilmiştir.

Son fiksatif işleminin sonunda tüpün dibinde kalan 0,5-0,7 mL'lik çökelti pipetaj yapılarak homojen hale getirilmiştir. Pastör pipetine çekilen bu süspansiyon, daha önceden 1 N HNO₃ (Nitrik asit)'te temizlenmiş ve % 70'lik etil alkolde buzdolabında bekletilen nemli lamalar üzerine 10-15 cm yükseklikten farklı alanlara damlatılmıştır. Hazırlanan bu preparatlar 24 saat oda sıcaklığında kurumaya bırakılmışlardır.

Preparatların boyanması

Her bir uygulama için yapılan preparatların bir kısmı, mitotik indeks, kromozomal anormallikler ve mikronükleus oluşumlarının tespiti için, homojen boyamada kullanılmıştır. Bunun için preparatlar kuruduktan sonra Sorensen tamponu ile hazırlanmış % 5'lik Giemsa ile (pH=6,8) 15-20 dakika boyanmıştır. Preparatların bir kısmı ise, bir kromozoma ait kardeş kromatidlerin farklı boyanmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Bu yöntemde göre bir gün boyunca kurutulan preparatlar düz bir tepsiye konarak üzeri ince bir tabaka halinde ışınlama solüsyonu (Sorensen tamponu, pH=6,8) ile kapatılmıştır. Bu preparatlar, 15 cm yükseklikten, 254 nm (nanometre) dalga boyunda ışık yayabilen UV lambası ile karanlıkta 13 dakika ışınlanmıştır. Preparatlar 60°C sıcaklıktaki 1xSSC (Sodyum klorür + Tri-Sodyum sitrat) solüsyonunda 1 saat inkübe edildikten sonra, Sorensen tamponu ile hazırlanan % 5'lik Giemsa ile (pH= 6,8) 20 dakika boyanmıştır.

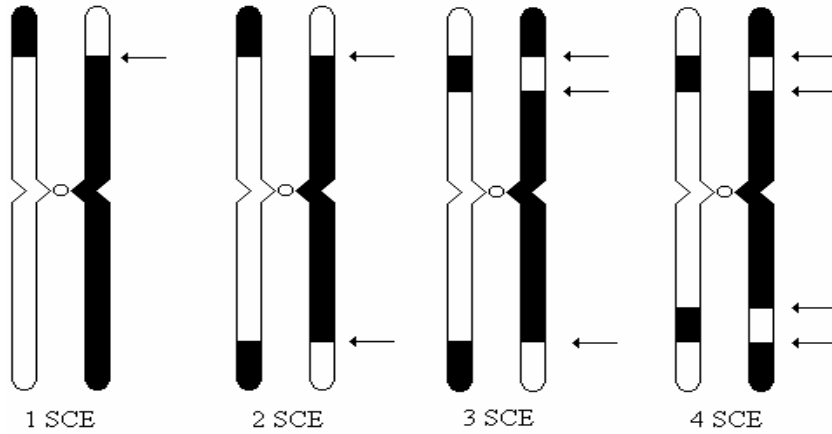
Her iki yöntemde de Giemسادan çıkarılan preparatlar saf sudan geçirilerek, boyanın fazlasının akması sağlanmıştır. Oda sıcaklığında kurutulan preparatlar, DPX ile daimi hale getirilmiş ve mikroskopik incelemeye alınmıştır.

Mitotik indeks ve kromozom anormalliklerinin saptanması

Mitotik indeksin (Mİ) saptanmasında, bütün uygulamalar için kadın ve erkek bireye ait preparatların her birinden 1000'er hücre olmak üzere toplam 2000 hücre incelenmiştir. Bölünen hücre sayısının toplam hücreye oranı yüzde cinsinden hesaplanarak mitotik indeks belirlenmiştir. Kromozomal anormalliklerin saptanmasında, her bir uygulama için kadın ve erkek bireye ait preparatlarda 46 ± 1 kromozomlu ve kromozomları iyi dağılmış olan 100'er hücre (toplam 200 hücre) değerlendirilerek kromozom anormallikleri tespit edilmiştir. İncelenen toplam hücre içindeki anormal hücrelerin yüzdesi ve hücre başına düşen kromozom anormalliği (KA/Hücre) sayısı belirlenmiştir.

Replikasyon İndeksi ve Kardeş kromatid değişiminin saptanması

Replikasyon indeksini hesaplamak için kadın ve erkek bireyden hazırlanan preparatların her birinden 100 hücre olmak üzere her uygulama için toplam 200 hücre incelenmiştir. İncelenen hücreler arasında birinci (M_1), ikinci (M_2) ve üçüncü (M_3) metafaz evresindeki hücreler sayılmış ve replikasyon indeksi (RI) = $1 \times (M_1) + 2 \times (M_2) + 3 \times (M_3) / N$ (N = incelenen toplam hücre sayısı) formülüyle hesaplanmıştır. Kardeş kromatid değişimi (KKD) sayısının belirlenmesinde, kadın ve erkek bireye ait preparatların her birisinde, kromozomları iyi dağılmış ve ikinci mitoz bölünme geçiren 25'er hücre olmak üzere, her bir uygulama dozu için toplam 50 hücre incelenmiştir. Kardeş kromatid değişimi sayısı, bir kromozomun açık boyanmış kromatidindeki koyu boyanmış parçaların veya koyu boyanmış kromatidindeki açık boyanmış parçaların sayılmasıyla, oluşan kırılma sayısına göre birli, ikili, üçlü ve dörtlü değişimler olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Birli, ikili, üçlü ve dörtlü kardeş kromatid değişimleri

Nükleer Bölünme İndeksi ve Mikronükleus Frekansının Saptanması

Daimi hale getirilmiş preparatlarda her bir doz ve süre için erkek ve dişi donörde toplam olarak 2000 binükleat hücrede mikronükleus frekansları belirlenmiştir. Nükleer bölünme indeksi belirlenirken, her bir donörden 500 hücre sayılmış ve $1 \times N_1 + 2 \times N_2 + 3 \times (N_3 + N_4) / N$ formülünden yararlanılarak 1, 2, 3, 4 çekirdekli hücrelerin sayısına göre nükleer bölünme indeksi tespit edilmiştir.

3.2.2. İzole Edilmiş İnsan Lenfositlerindeki Çalışmalar

Comet Testi

Komet tekniği, Singh ve ark.'nın (1988) yaptığı çalışmalar dikkate alınarak ve bazı modifikasyonlarla kullanılmıştır. Bu test tekniğinde de her bir katkı maddesi için ayrı ayrı sağlıklı ve sigara içmeyen bir bayan ve bir erkek bireyden alınan periferel kan lenfositleri kullanılmıştır. Bu amaçla donörlerden heparinli enjektörle alınan taze periferel kan ependorflara konulmuştur. Daha sonra içerisinde 1'er mL PBS bulunan ependorflara, stok kandan 100'er µl eklenmiş, süspanse edilmiş ve 10 dak. buz dolu kapta bekletilmiştir. Süre sonunda, her bir ependorfun dip kısmına 100'er µl lenfosit ayırıcı solüsyon (Biocoll) eklenmiş ve 4 °C'de 1060 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorfların içerisinde eritrostlerin üzerinde oluşan

bulutsu kısmın 100'er µl'si alınarak ayrı ependorfa aktarılmış ve buz üzerine konulmuştur. Daha sonra stok haline getirilmiş izole lenfositlerin 100'er µl'si kullanılacak her bir doz için ayrı ependorflara alınmıştır.

Lenfositler, 100'er µl test maddesinin çeşitli dozları ile (sitrik asitin 50, 100, 200 ve 3000 µg/mL'lik, benzoik asitin 50, 100, 200 ve 500 µg/mL'lik, kalsiyum propiyonatin 50, 100, 200 ve 1000 µg/mL'lik, fosforik asitin 25, 50, 100 ve 200 µg/mL'lik, sitrik asit ve fosforik asit karışımının 25, 50, 100 ve 200 µg/mL'lik, pozitif kontrolün 0.30 µg/mL'lik dozları) süspanse edilmiş ve 37 °C'de 1 saat inkübasyona alınmıştır. İzole edilen lenfositlerde, trypan blue ile hücrelerin canlılıklarının $\geq$ % 97 olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin bitiminde ependorflar 3000 rpm'de 5 dak. santrifüj edilmiş, süpernatant atılmış ve her bir doz için 100'er µl PBS ile resüspanse edilmiştir. Düşük erime ısıly agarın 75 µl'si, 100 µl lenfositle karıştırılıp, önceden yüksek erime ısıly agar ile kaplanan lamaların üzerine damlatılmış ve 24X60 mm'lik lamel ile kapatılmıştır. Bu halde preparatlar 15-20 dak. buzdolabında bekletilmiştir.

Lamaların üzerindeki lameller dikkatlice kaldırılmış ve içerisinde lizing solüsyonu bulunan şaleler içerisine konulmuş ve buzdolabında en az 1 saat bekletilmiştir. Liziz işleminden sonra lamalar, içerisinde elektroforez tamponu (pH>13) bulunan tanka yerleştirilmiş ve DNA sarmalının çözülmesi için 20 dak. bekletilmiştir. Daha sonra 25 V, 300 mA'da 20 dakika elektroforez yapılmıştır. Preparatlar, nötralizasyon tamponu (pH=7.5) ile 5'er dakika, toplam 3 kez muamele edilmiştir. Nötralizasyon sonucunda lamaların üzerine 20 µg/ml'lik etidyum bromid'in 50 µl'si yayılmış ve 24X60 mm'lik lamel ile kapatılmıştır. Boyamaya alınan preparatlar +4 °C'de 10-15 dakika bekletilmiştir. Tüm bu işlemler, çevre kaynaklı DNA hasarını önlemek amacıyla karanlık ortamda yapılmıştır.

Görüntü Analizi ve Komet Sayımı

Boyanan preparatlar Olympus marka flörsan mikroskop (546 nm eksitasyon ve 590 nm bariyer filtrelili) altında 40X büyütmede incelenmiştir. Kullanılan her bir kimyasal

için her bir donörden 100'er komet olmak üzere toplam 200 komet "Comet Assay IV, Perceptive Instruments Ltd., UK" kullanılarak incelenmiş ve sonuçlar % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu cinsinden değerlendirilmiştir.

İstatistiksel Analizler

Yapılan çalışmada, mitotik indeks, replikasyon indeksi, nükleer bölünme indeksi, hücre başına düşen kardeş kromatid değişimi sayısı, anormal hücre frekansı, hücre başına düşen kromozom anormalliği, mikronükleus frekansı ve % kuyruk yoğunluğu ve kuyruk uzunluğu için doz-etki ilişkisini ortaya koymak amacıyla SPSS 13.0 bilgisayar programıyla regresyon analizi uygulanmıştır. Deney gruplarındaki mitotik indeks, replikasyon indeksi, nükleer bölünme indeksi, kromozomal anormallikler ve mikronükleus frekanslarının kontrol grupları ile farklılık gösterip göstermediğinin belirlenmesinde z dağılım testi kullanılırken, kardeş kromatid değişimleri ve komet değerlendirilmesinde *students-t* testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Sitrik Asit Uygulaması

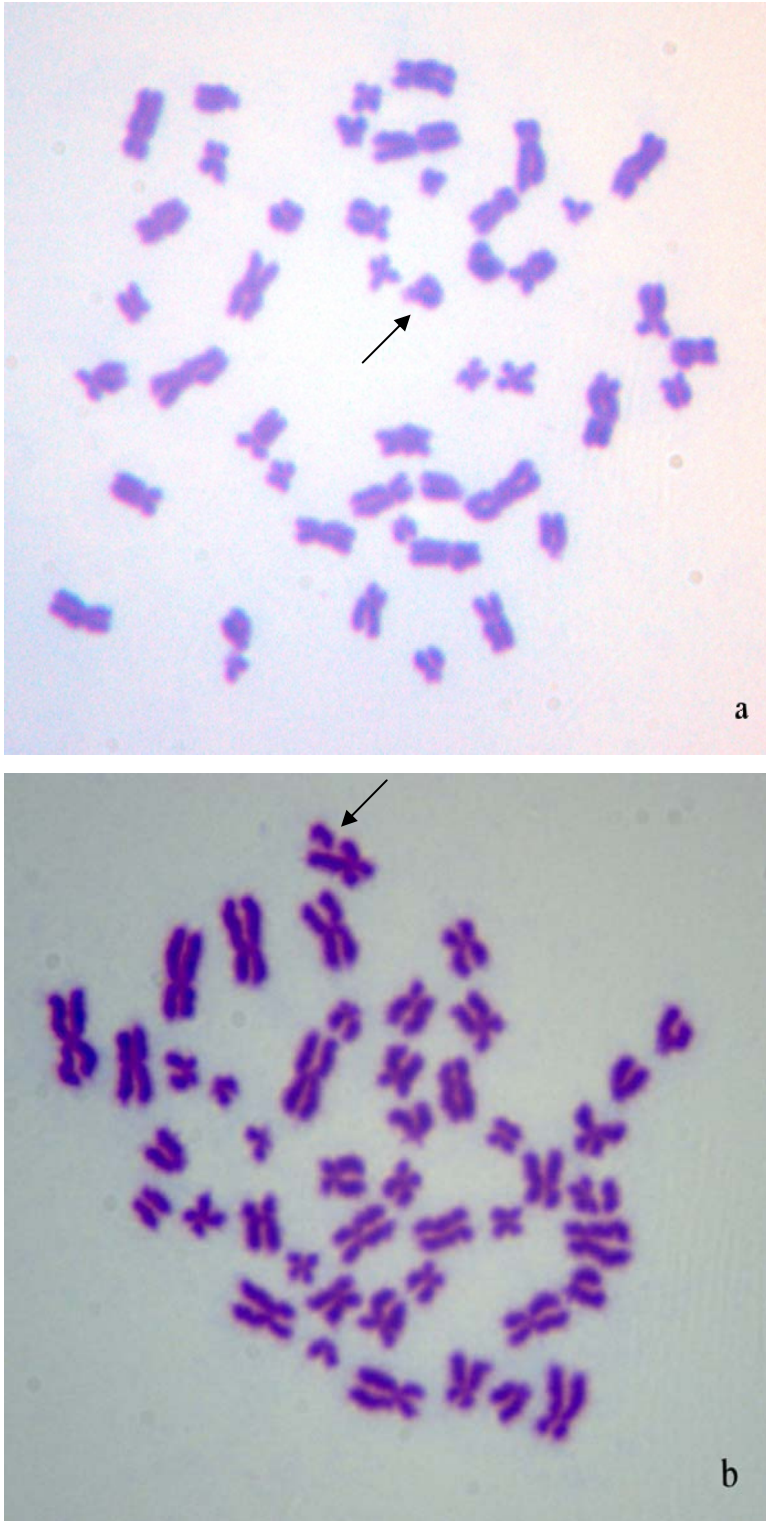
Sitrik asit uygulaması ile insan lenfosit kültürlerinde 5 tip yapısal, 2 tip de sayısal olmak üzere toplam 7 tip anormalliğin olduğu saptanmıştır. Bunlardan yapısal anormallikler kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, kromatid değişimi ve disentrik kromozomlardır. Sayısal anormallikler ise poliploidi ve endoreduplikasyon'dur (Resim 4.1 - 4.4). Bu anormalliklerden en sık rastlanılanları kardeş kromatidlerde birleşme ve kromatid kırığıdır. Yapılan analizler, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,87$, 48 saatlik uygulamada $r=0,67$) (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Sitrik asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

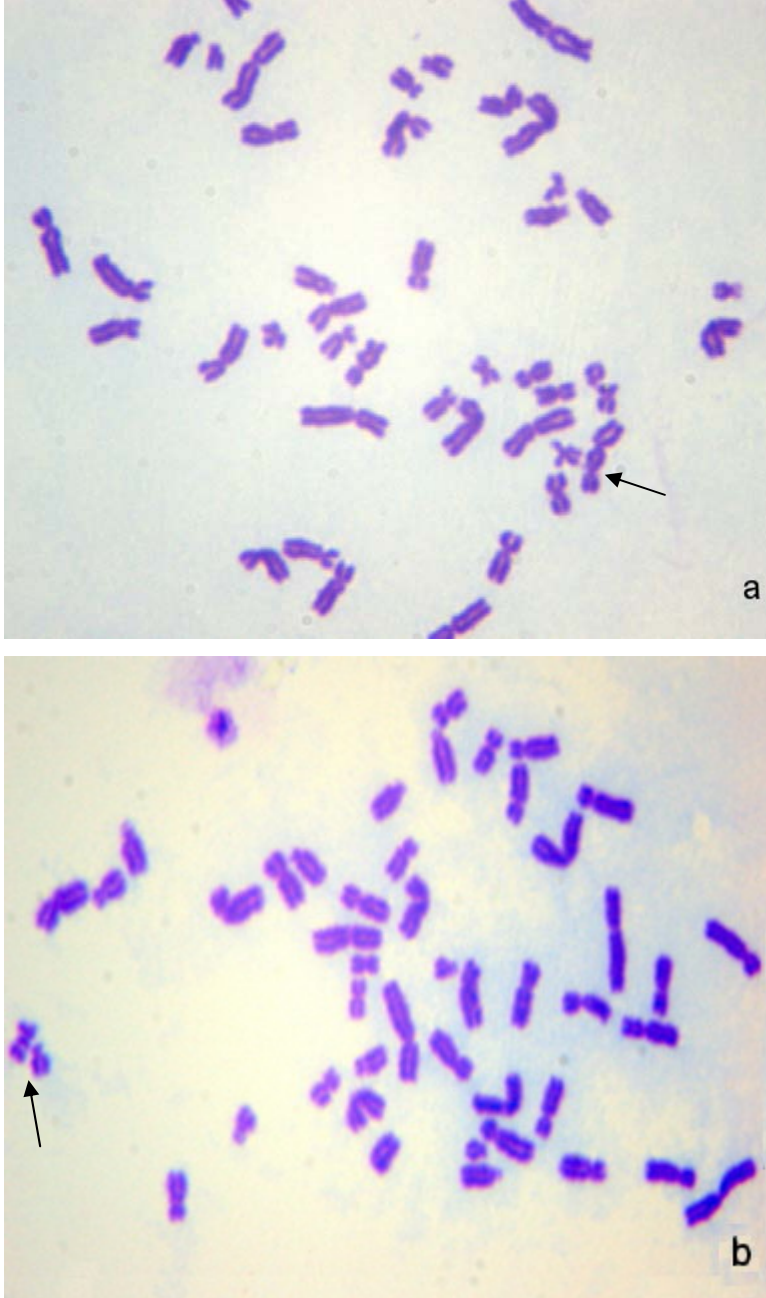
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	Yapısal					Sayısal			
			kbb	ktk	dis	kzk	ktk	p	er		
Kontrol	24	0,00	2	-	-	-	-	-	-	1,00 ± 1,10	0,025 ± 0,01
Pozitif Kontrol	24	0,10	18	25	7	3	12	3	-	30,00 ± 3,24	0,325 ± 0,03
Sitrik asit	24	50	15	4	5	1	-	1	1	12,50 ± 2,34*	0,135 ± 0,02*
		100	25	5	7	1	-	5	-	19,00 ± 2,77*	0,190 ± 0,03*
		200	35	5	10	-	-	5	-	20,00 ± 2,83*	0,250 ± 0,03*
		3000	-	-	-	-	-	-	-	Toksik	Toksik
Kontrol	48	0,00	3	1	-	-	-	-	-	2,00 ± 0,98	0,020 ± 0,01
Pozitif Kontrol	48	0,10	42	7	6	-	31	3	-	34,00 ± 3,35	0,430 ± 0,04
Sitrik asit	48	50	34	2	2	-	-	1	-	19,00 ± 2,77*	0,190 ± 0,03*
		100	27	9	-	-	1	1	-	18,50 ± 2,75*	0,185 ± 0,03*
		200	30	2	3	1	1	4	-	18,50 ± 2,75*	0,185 ± 0,03*
		3000	-	-	-	-	-	-	-	Toksik	Toksik

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, kbb: kardeş kromatidlerde birleşme, dis: disentrik, er: endoreduplikasyon, kd: kromatid değişimi, p: poliploidi

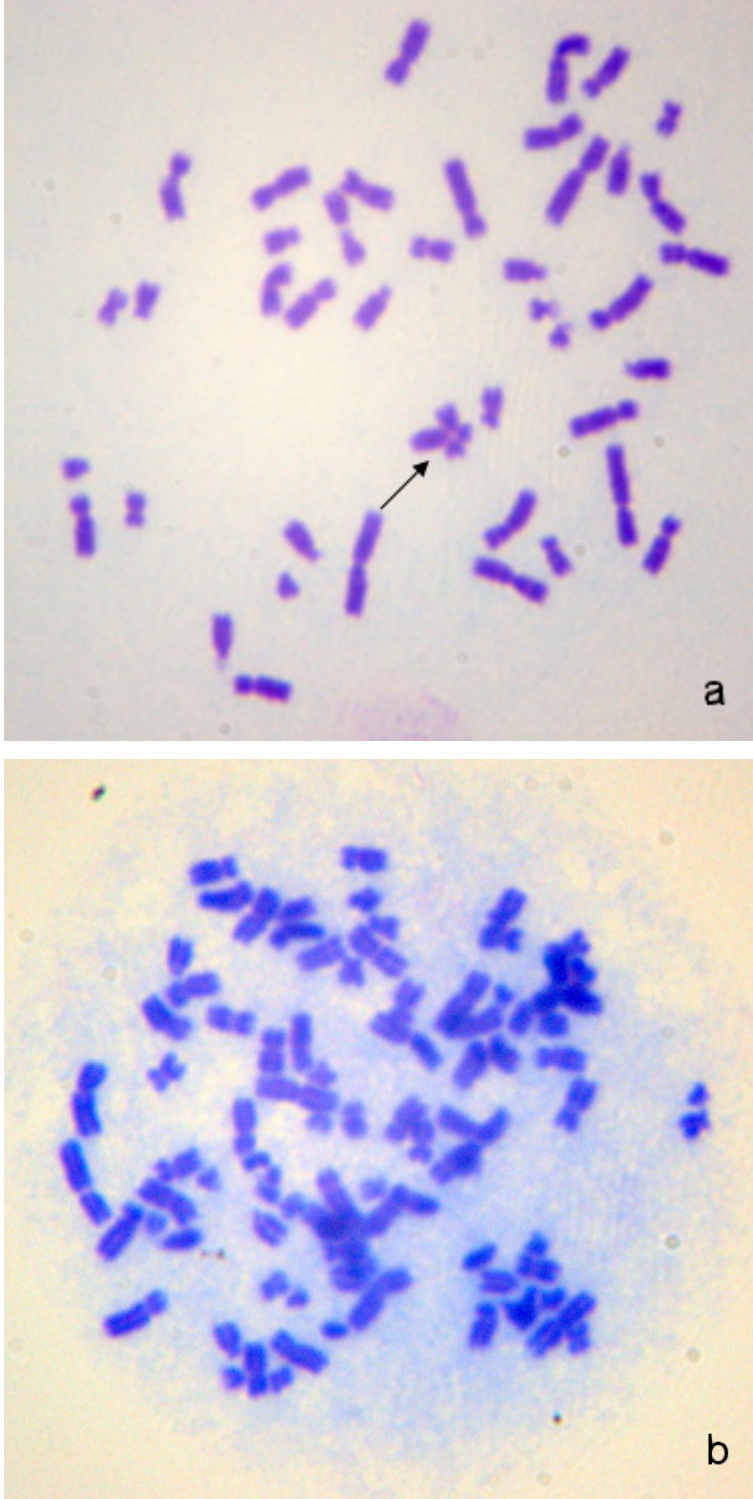
*Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



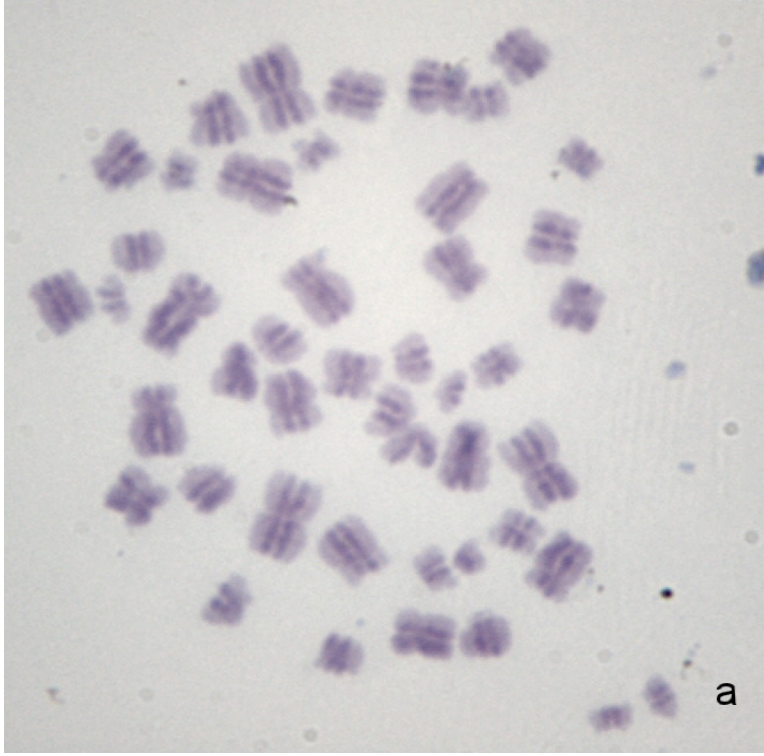
Resim 4.1. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kardeş kromatitlerde birleşme, b) kromatit kırığı



Resim 4.2. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) disentrik kromozom, b) kromozom kırığı



Resim 4.3. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid değişimi, b) poliploidi



Resim 4.4. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) endoreduplikasyon

Kardeş kromatid değişim frekansı $50 \mu\text{g/ml}$ 'nin 24 saatlik uygulaması hariç tüm uygulamalarda kontrole göre istatistiksel açıdan önemli düzeyde artış göstermiştir ve bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,97$, 48 saatlik uygulamada $r=0,96$) (Çizelge 4.2, Resim 4.5). Yapılan çalışmalarda sitrik asidin replikasyon indeksi üzerine herhangi bir etkisi gözlenememiştir. Mitotik indeks tüm uygulamalarda kontrole göre doza bağlı düşüş göstermiştir. Bu düşüş, istatistiksel olarak önemli düzeydedir (24 saatlik uygulamanın $50 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonu hariç) (24 saatlik uygulama için $r=-0,88$, 48 saatlik uygulama için $r=-0,67$). $3000 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyon ise tüm uygulamalarda toksik etki göstermiştir (Çizelge 4.2).

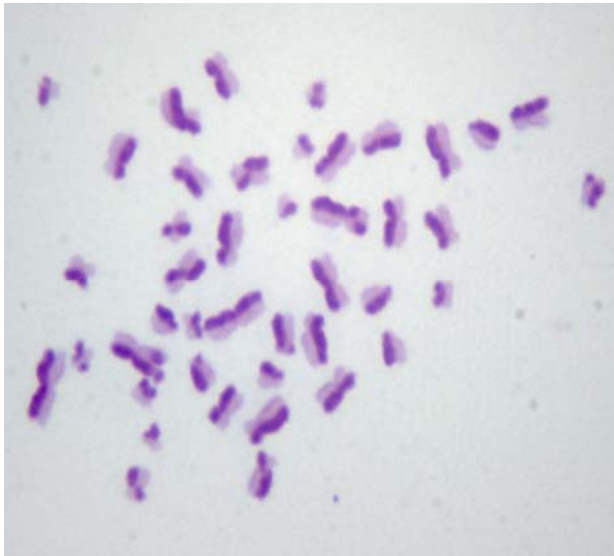
Çizelge 4.2. Sitrik asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min.-maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	1-19	4,70 ± 0,45	42	81	77	2,18 ± 0,053	7,60 ± 0,59
Pozitif Kontrol	24	0,10	9-53	32,20 ± 1,65	48	99	53	2,03 ± 0,052	4,80 ± 0,47
Sitrik asit	24	50	1-17	5,52 ± 0,43	22	61	117	2,48 ± 0,048	6,70 ± 0,56
		100	2-23	5,82 ± 0,46+	46	64	91	2,24 ± 0,056	5,10 ± 0,49*
		200	1-23	6,32 ± 0,56+	52	69	79	2,14 ± 0,045	5,00 ± 0,48**
		3000	-	Toksik	-	-	-	Toksik	Toksik
Kontrol	48	0,00	1-13	3,36 ± 0,27	39	70	91	2,26 ± 0,054	10,40 ± 0,68
Pozitif Kontrol	48	0,10	22-69	46,38 ± 1,72	110	72	18	1,54 ± 0,046	6,30 ± 0,54
Sitrik asit	48	50	1-14	5,48 ± 0,36+	49	79	72	2,12 ± 0,054	7,20 ± 0,57**
		100	3-14	5,76 ± 0,32+	50	69	81	2,16 ± 0,056	6,60 ± 0,53**
		200	3-15	7,20 ± 0,43+	50	68	82	2,16 ± 0,056	7,10 ± 0,57**
		3000	-	Toksik	-	-	-	Toksik	Toksik

+ Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



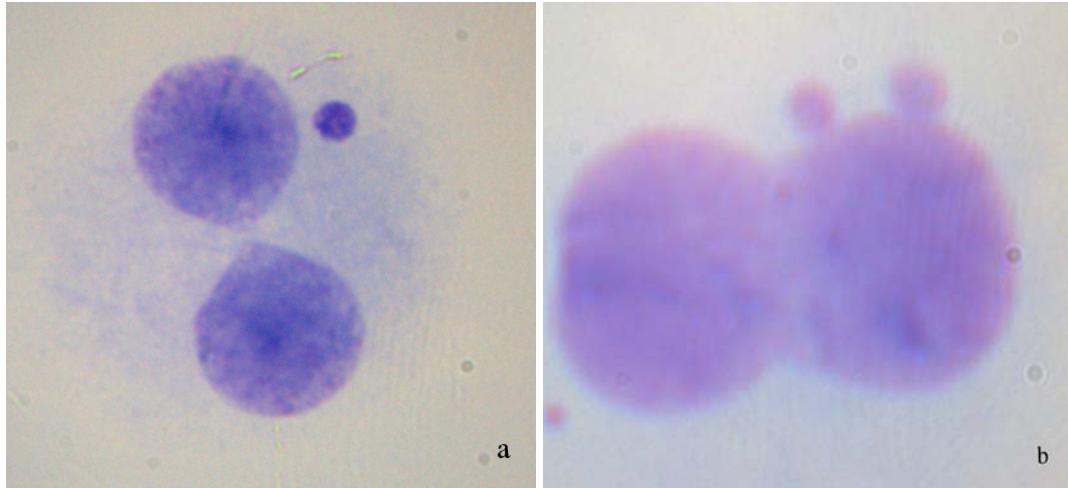
Resim 4.5. Sitrik asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri

Sitrik asit uygulamasıyla, kültürdeki insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları kontrole göre tüm uygulamalarda doza bağlı olarak önemli oranda artış göstermiştir ($r=0,88$) (Çizelge 4.3, Resim 4.6). Sitrik asit uygulamasıyla binükleat hücreler içerisinde bir, iki ve dört mikronükleus gözlenmiştir. Bununla birlikte sitrik asidin nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. Sitrik asitin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN ± SH (%)	Nükleer bölünme indeksi ± SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	0,00	2000	6	0	0	0	0,30±0,12	1,84±0,30
Pozitif Kontrol	48	0,10	2000	220	20	0	0	13,0±0,75	1,30±0,25
Sitrik Asit	48	50	2000	33	0	0	0	1,65±0,28*	1,43±0,27
		100	2000	45	1	0	0	2,35±0,34*	1,41±0,26
		200	2000	48	0	0	1	2,60±0,36*	1,34±0,26
		3000	-	-	-	-	-	Toksik	Toksik

* Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



Resim 4.6. Sitrik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat, b) iki mikronükleuslu binükleat

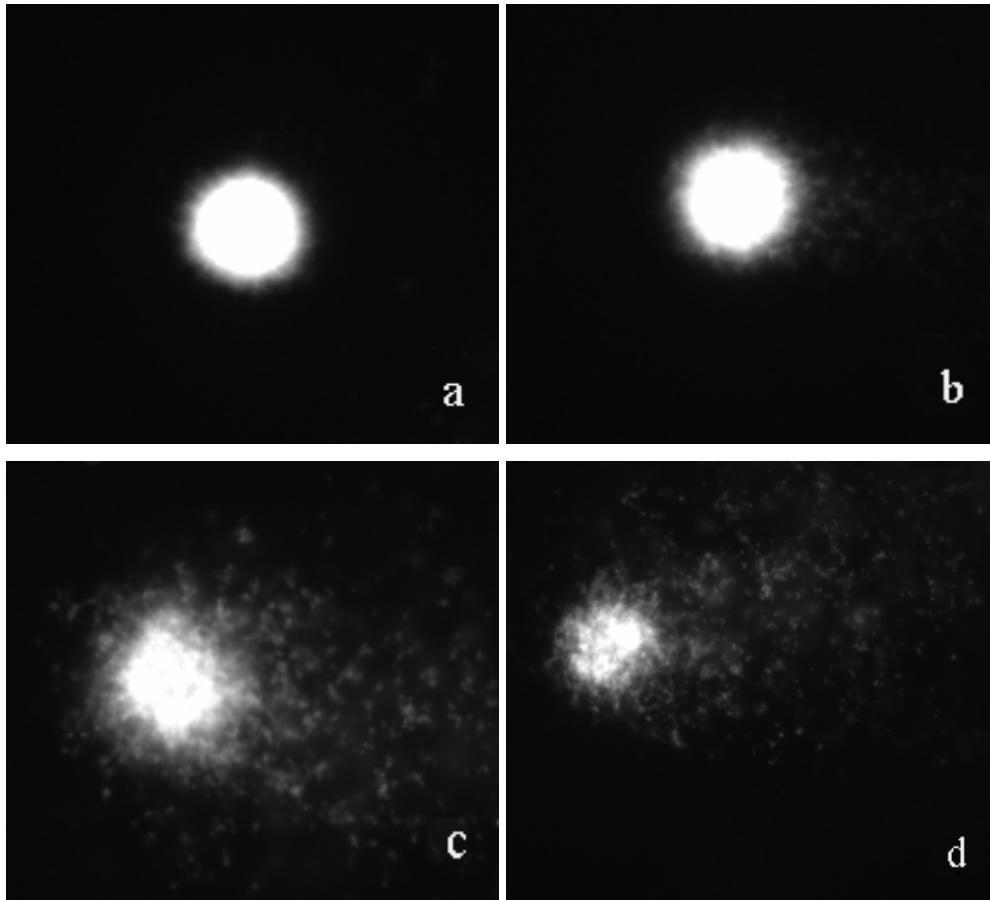
Sitrik asit, komet testinde kuyruktaki DNA yoğunluğunu ve komet kuyruk uzunluğunu, kontrole göre tüm konsantrasyonlarda artırmış ancak bu artış sadece en

yüksek doz olan 200 µg/ml’de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Çizelge 4.4, Resim 4.7). 200 µg/ml’lik konsantrasyon, pozitif kontrolden daha fazla DNA hasarına neden olmuştur.

Çizelge 4.4. Sitrik Asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)
Kontrol	0,00	5,81 ± 1,46	48,91 ± 1,82
Pozitif Kontrol	0,30	14,45 ± 1,64	68,65 ± 1,97
Sitrik Asit	50	5,88 ± 1,45	49,09 ± 1,62
	100	9,25 ± 2,48	51,73 ± 3,25
	200	16,10 ± 2,95+	74,92 ± 4,44+
	3000	Toksik	Toksik

+Kontrolle göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Resim 4.7. Sitrik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d) çok hasarlı DNA

4.2. Fosforik Asit Uygulaması

Fosforik asit uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde 5 tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlardan 4 tanesi yapısal (kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme ve disentrik kromozom), 1 tanesi ise sayısal (poliploidi) anormalliktir (Resim 4.8 - 4.10). Bu anormalliklerden en sık rastlanana kromatid kırığıdır. Yapılan analizler, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığını (25 µg/ml hariç) ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,70$, 48 saatlik uygulamada $r=0,94$) (Çizelge 4.5).

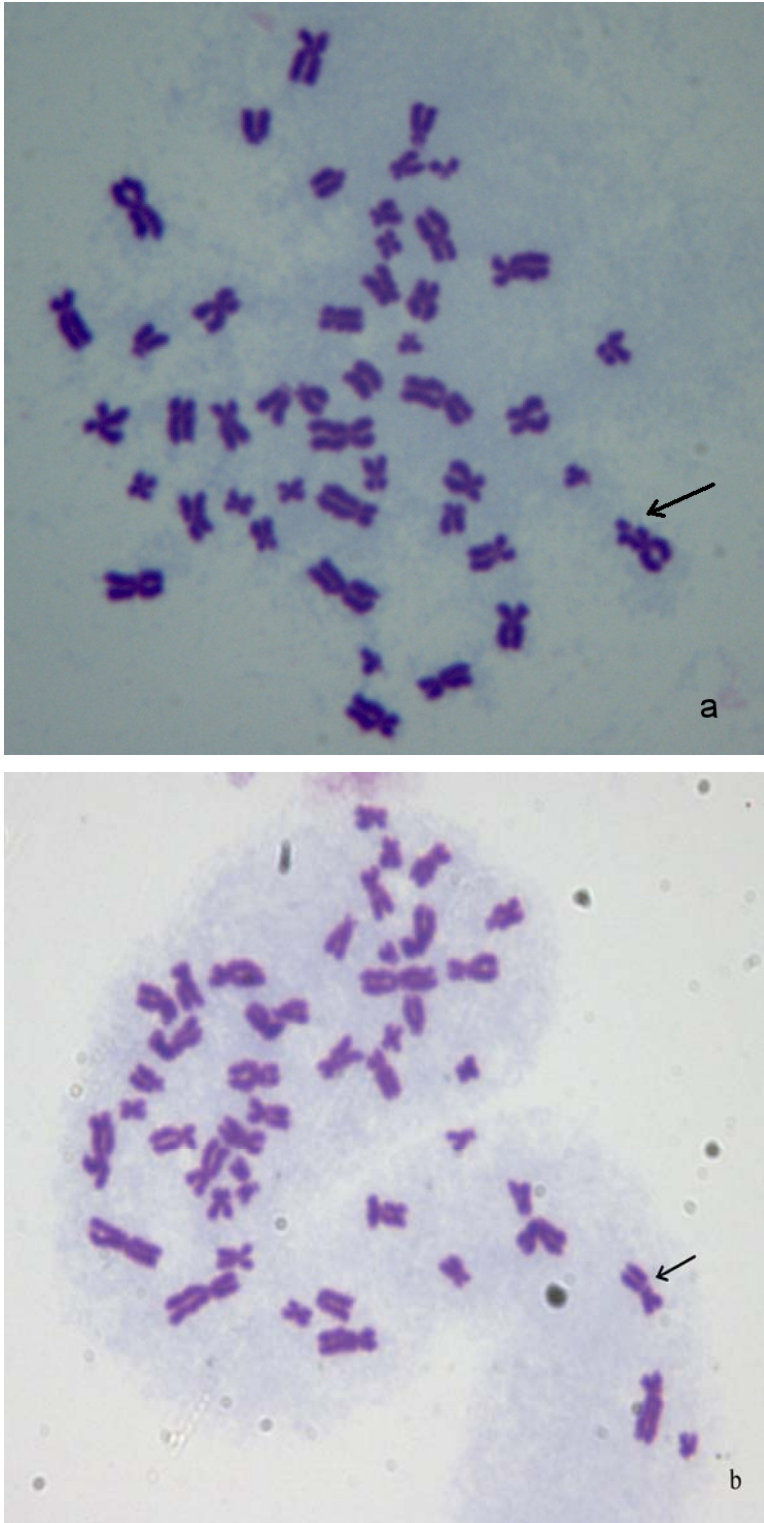
Çizelge 4.5. Fosforik Asit uygulaması ile periferik insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
			Yapısal					Sayısal			
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	ktk	kzk	ktd	f	kkb	dis	p		
Kontrol	24	0,00	1	-	-	2	-	-	-	1,50 ± 0,86	0,015 ± 0,008
Pozitif kontrol	24	0,10	26	2	10	2	2	-	-	21,00 ± 2,88	0,210 ± 0,029
Fosforik asit	24	25	7	-	-	-	1	-	-	4,00 ± 1,39	0,040 ± 0,013
		50	11	1	-	-	1	-	1	7,00 ± 1,80*	0,070 ± 0,018*
		100	11	2	-	-	1	1	-	7,50 ± 1,86*	0,075 ± 0,019*
		200	12	-	-	-	2	-	-	7,00 ± 1,80*	0,070 ± 0,018*
Kontrol	48	0,00	1	-	-	2	-	-	-	1,50 ± 0,86	0,015 ± 0,013
Pozitif kontrol	48	0,10	63	15	33	11	2	-	-	45,00 ± 3,52	0,620 ± 0,034
Fosforik Asit	48	25	8	-	-	-	1	-	-	4,50 ± 1,47	0,045 ± 0,015
		50	10	2	-	-	1	1	-	7,00 ± 1,80*	0,070 ± 0,018*
		100	15	1	-	-	-	1	1	9,00 ± 2,02**	0,090 ± 0,020**
		200	19	-	-	-	4	1	-	11,50 ± 2,25**	0,120 ± 0,023**

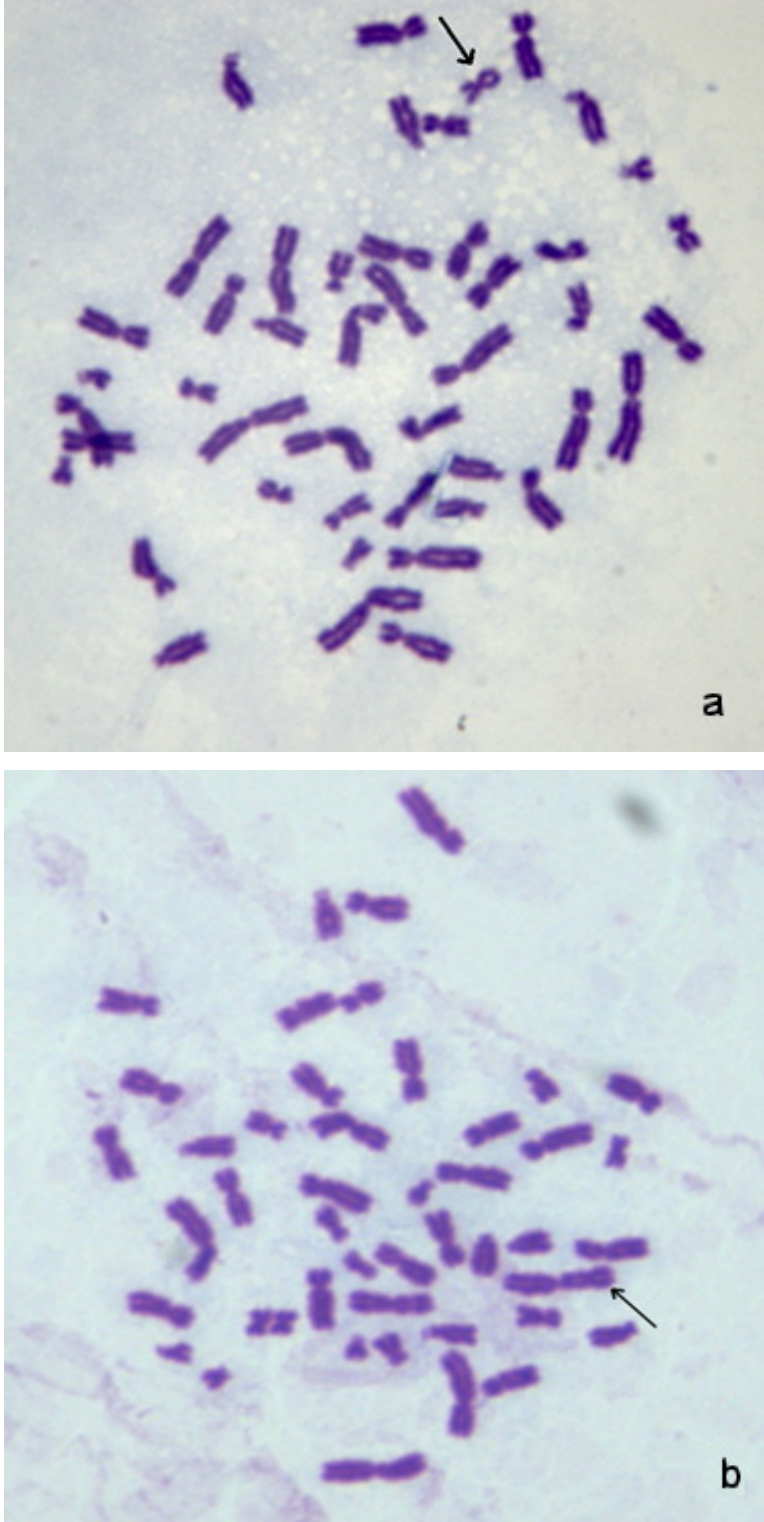
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, ktd: kromatid değişimi, f: fragment, kbb: kardeş kromatidlerde birleşme, dis: disentrik kromozom, p: poliploidi.

* Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

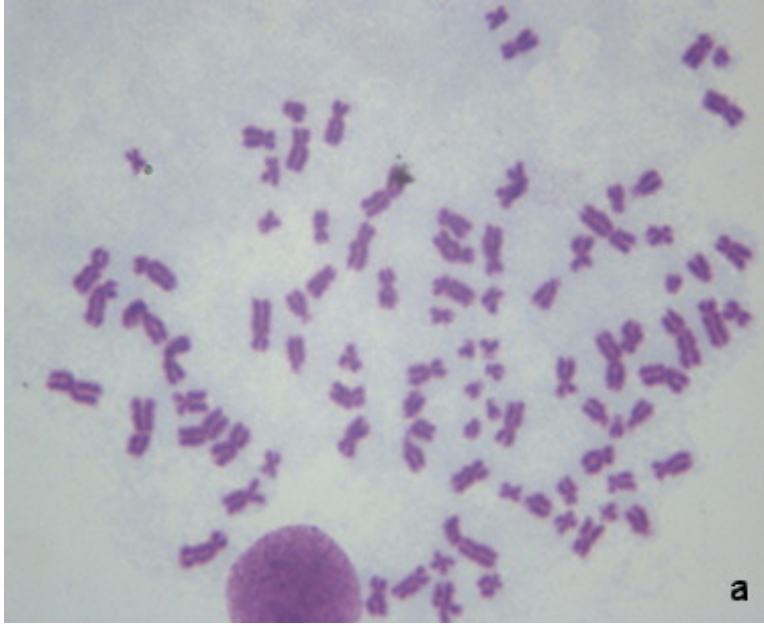
** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



Resim 4.8. Fosforik Asit uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı



Resim 4.9. Fosforik Asit uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kardeş kromatidlerde birleşme, b) disentrik kromozom



Resim 4.10. Fosforik Asit uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) poliploidi

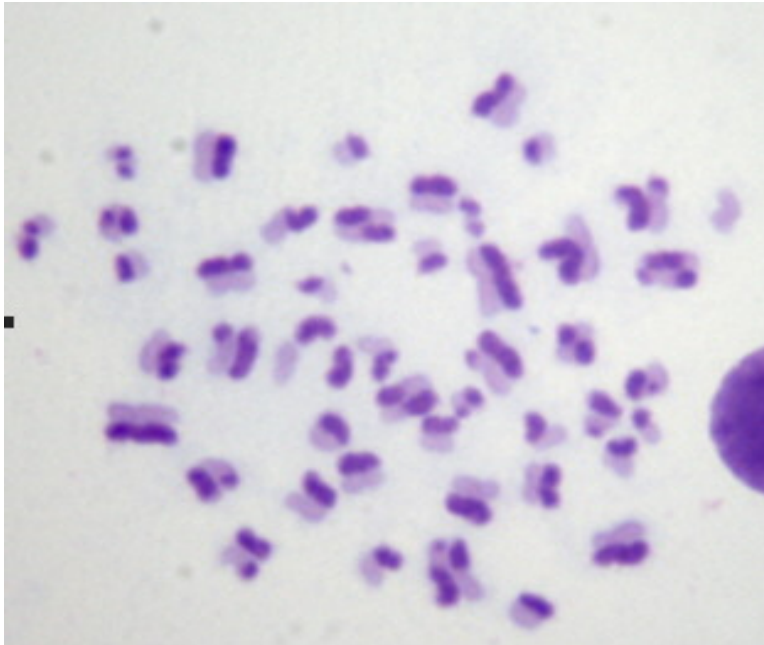
Fosforik asit uygulaması sonucunda, hem 24 saatlik ve hem de 48 saatlik uygulamada, tüm konsantrasyonlarda, kardeş kromatid değişimi frekansı kontrole göre istatistiksel açıdan önemli düzeyde artış göstermiştir. Bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,89$, 48 saatlik uygulamada $r=0,87$) (Çizelge 4.6, Resim 4.11). Fosforik asit ile hücrelerde minimum 2 ve maksimum 24 arasında kardeş kromatid değişimi gözlenmiştir. Bu uygulamada, mitotik indeks, 24 saatlik sürede, 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda düşüş gösterirken, 48 saatlik uygulamada 50 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonlar istatistiksel olarak anlamlı düşüş göstermiştir (Çizelge 4.6). Yapılan çalışmalarda fosforik asitin replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Fosforik Asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0.00	0-7	3,12 ± 0,28	33	43	121	2,41 ± 0,049	7,45 ± 0,59
Pozitif kontrol	24	0,10	22-44	34,06 ± 0,90	98	81	21	1,62 ± 0,047	4,20 ± 0,45
Fosforik asit	24	25	2-11	4,04 ± 0,27+	41	66	103	2,41 ± 0,057	7,25 ± 0,58
		50	2-9	4,44 ± 0,20+	56	75	69	2,07 ± 0,064	6,30 ± 0,54
		100	4-12	6,26 ± 0,28+	49	62	89	2,20 ± 0,057	5,90 ± 0,53*
		200	3-13	6,30 ± 0,29+	45	57	98	2,27 ± 0,057	5,60 ± 0,51*
Kontrol	48	0.00	0-7	3,14 ± 0,28	33	44	123	2,45 ± 0,054	7,40 ± 0,59
Pozitif kontrol	48	0,10	42-68	53,74 ± 0,95	97	88	15	1,59 ± 0,044	3,10 ± 0,39
Fosforik Asit	48	25	2-22	6,54 ± 0,49+	34	54	112	2,39 ± 0,054	6,85 ± 0,56
		50	3-13	6,48 ± 0,33+	26	57	117	2,46 ± 0,050	5,75 ± 0,52*
		100	2-21	7,20 ± 0,46+	45	51	108	2,36 ± 0,058	6,00 ± 0,53
		200	6-24	9,06 ± 0,48+	31	56	113	2,41 ± 0,053	5,50 ± 0,51*

+Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

* Kontrole göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (z testi)



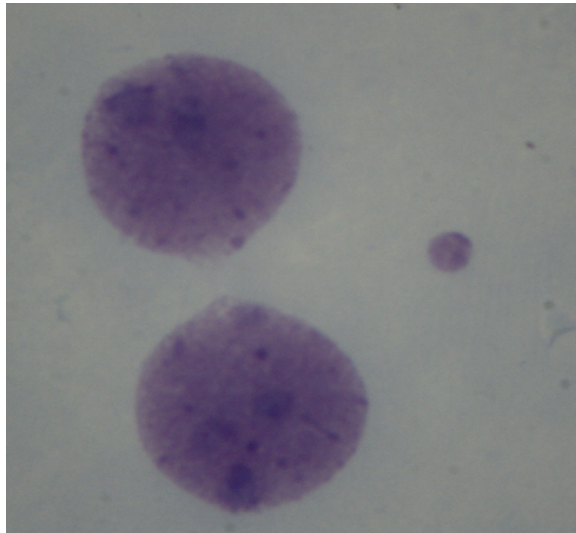
Resim 4.11. Fosforik Asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri

Fosforik asit uygulamasıyla, mikronukleus taşıyan binukleat hücrelerin frekansında da artışlar meydana gelmiştir. Bu artış, kontrole göre, 25 µg/ml hariç, tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Mikronukleus frekansındaki artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,73$) (Çizelge 4.7, Resim 4.12). Fosforik asit, insan lenfositlerinde sadece bir mikroçekirdekli binukleat hücrelerin oluşmasına neden olmuştur. Fosforik asit uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Fosforik Asitin insan lenfositlerinde mikronukleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binukleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronukleus frekansları			MN $\pm$ SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi $\pm$ SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)		
Kontrol	48	0,00	2000	2	-	-	0,10 $\pm$ 0,07	1,84 $\pm$ 0,42
Pozitif Kontrol	48	0,10	2000	44	-	-	2,20 $\pm$ 0,33	1,29 $\pm$ 0,36
Fosforik Asit	48	25	2000	5	-	-	0,25 $\pm$ 0,11	1,69 $\pm$ 0,41
		50	2000	10	-	-	0,50 $\pm$ 0,16*	1,68 $\pm$ 0,41
		100	2000	9	-	-	0,45 $\pm$ 0,15*	1,54 $\pm$ 0,39
		200	2000	10	-	-	0,50 $\pm$ 0,16*	1,71 $\pm$ 0,41

*Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z testi)



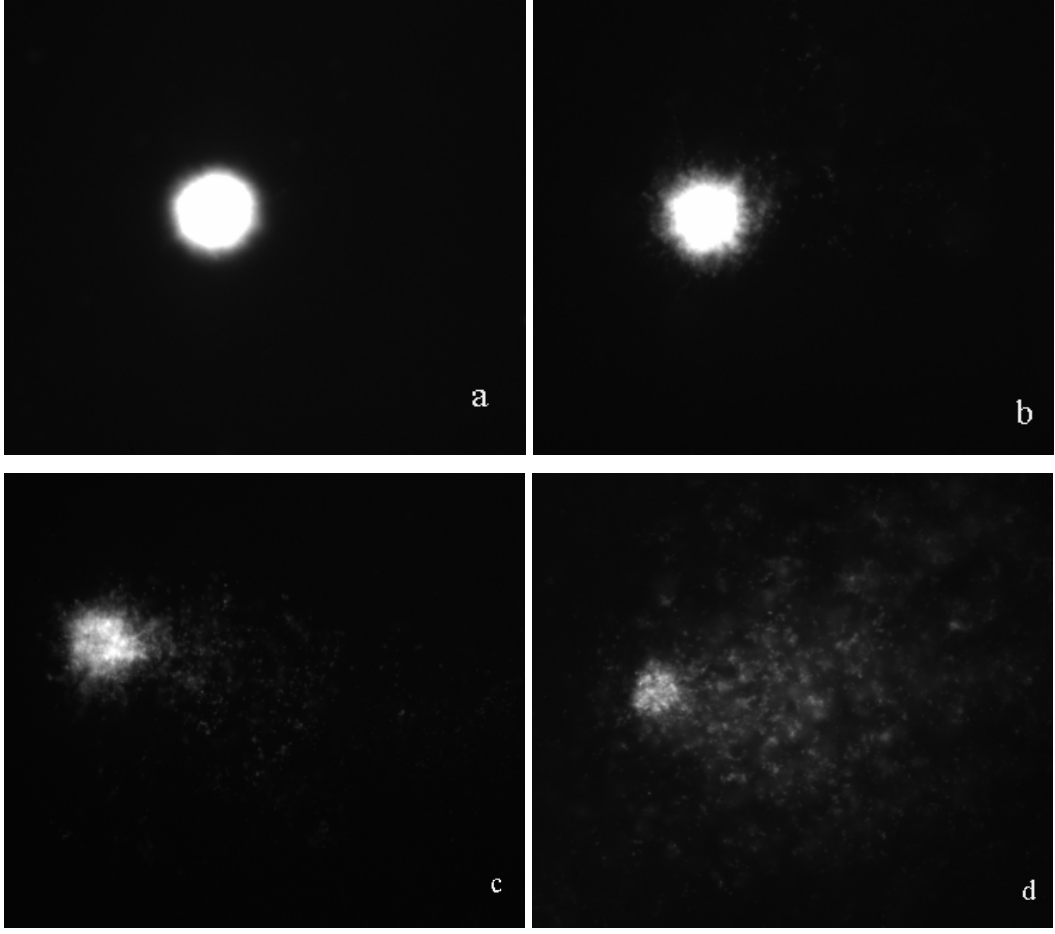
Resim 4.12. Fosforik Asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronukleuslu binukleat hücre (binukleat hücredeki 1 mikronukleus)

Fosforik asit uygulaması sonucunda, komet testi ile, primer DNA hasarlarının olduğu gözlenmiştir. DNA hasarları, kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeydedir. Fosforik asit uygulaması lenfositlerde komet kuyruğundaki DNA yoğunluğunu ve kuyruk uzunluğunu önemli düzeyde artırmıştır. Özellikle 200 µg/ml dozda kontrole göre 5 kat artış gözlenmiştir (Çizelge 4.8, Resim 4.13). Yine fosforik asitin çalışmada kullanılan tüm dozları, pozitif kontrol olan MMC'den daha fazla DNA hasarına neden olmuştur.

Çizelge 4.8. Fosforik Asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test maddesi	Doz (µg/ml)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (µm)
Kontrol	0,00	5.81 ± 1.46	48.91 ± 1.82
Pozitif Kontrol	0,30	14,45 ± 1,64	68.65 ± 1.97
Fosforik Asit	25	10,64 ± 1,26+	77,54 ± 4,11+
	50	11,60 ± 1,35+	73,58 ± 3,10+
	100	11,41 ± 1,09+	77,22 ± 3,09+
	200	53,74 ± 1,90+	251,08 ± 4,83+

+ Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Resim 4.13. Fosforik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d) çok hasarlı DNA

4.3. Benzoik Asit Uygulaması

Benzoik asit ile yapılan uygulama sonucunda, insan lenfositlerinde toplam 7 tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlardan 6 tanesi yapısal tiptedir. Bu anormallikler, kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, kromatid değişimi, fragment, ve disentrik kromozomlardır. Bu uygulama sonucunda 1 adet sayısal anormallik belirlenmiştir ki bu da poliploididir (Resim 4.14 - 4.17). Yapısal anormalliklerden en sık rastlanana kromatid kırığı ve kardeş kromatidlerde birleşmedir. Yapılan analizler anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada sırasıyla $r=0,95$ ve $0,97$, 48 saatlik uygulamada sırasıyla $r=0,85$ ve $r=0,83$) (Çizelge 4.9).

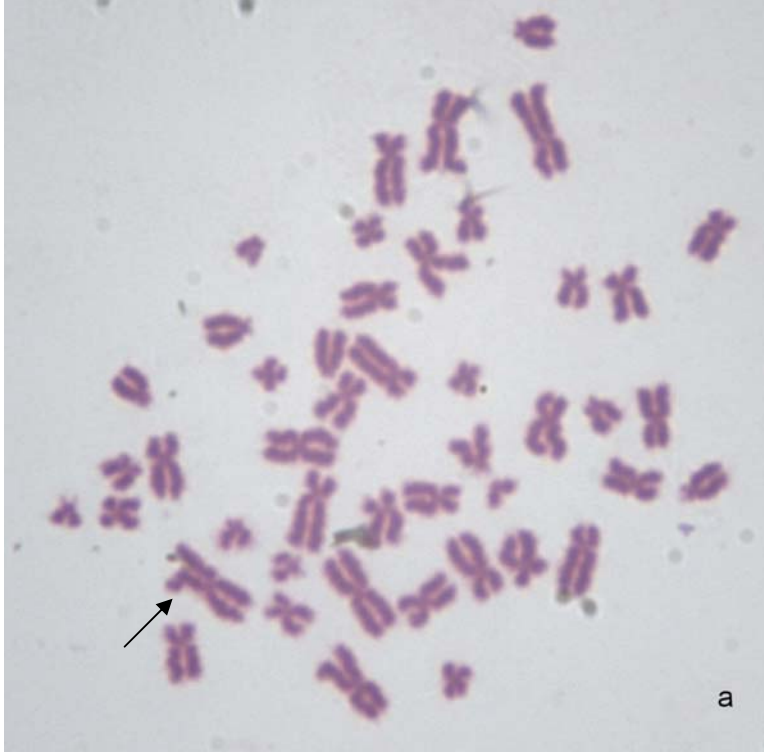
Çizelge 4.9. Benzoik asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/hücre ± SH
			Yapısal				Sayısal				
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)	ktk	kzk	ktd	f	dis	kkb	p		
Kontrol	24	0,00	1	-	-	-	-	1	-	1,00 ± 0,70	0,010 ± 0,007
Pozitif Kontrol	24	0,10	20	5	1	2	-	11	-	19,00 ± 2,77	0,195 ± 0,028
Benzoik asit	24	50	13	-	-	-	-	2	-	7,50 ± 1,86*	0,075 ± 0,019*
		100	11	2	1	-	4	1	-	9,50 ± 2,07**	0,095 ± 0,027**
		200	15	2	-	-	2	4	2	12,50 ± 2,34**	0,125 ± 0,023**
		500	28	10	-	-	5	2	-	20,00 ± 2,83**	0,225 ± 0,030**
Kontrol	48	0,00	4	-	-	-	1	-	-	2,50 ± 1,10	0,025 ± 0,011
Pozitif Kontrol	48	0,10	27	3	7	2	4	10	-	24,00 ± 3,02	0,265 ± 0,031
Benzoik asit	48	50	10	4	-	1	1	5	-	10,50 ± 2,17*	0,105 ± 0,022*
		100	14	2	-	1	2	3	-	11,50 ± 2,26**	0,115 ± 0,023**
		200	15	3	-	3	3	5	-	13,00 ± 2,38**	0,145 ± 0,025**
		500	14	6	-	2	3	10	-	17,50 ± 2,69**	0,175 ± 0,027**

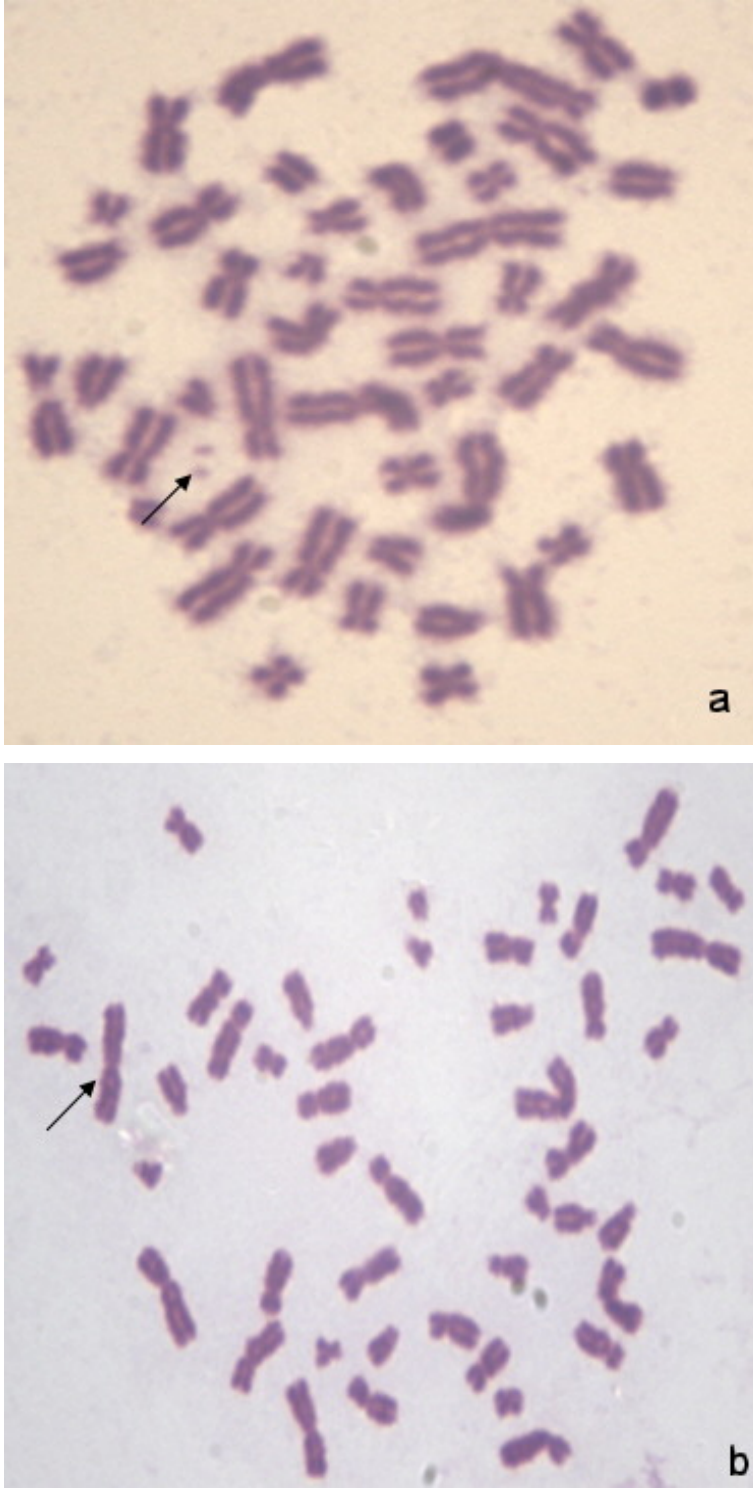
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, ktd: kromatid değişimi, f: fragment, dis: disentrik kromozom, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, p: poliploidi.

* Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

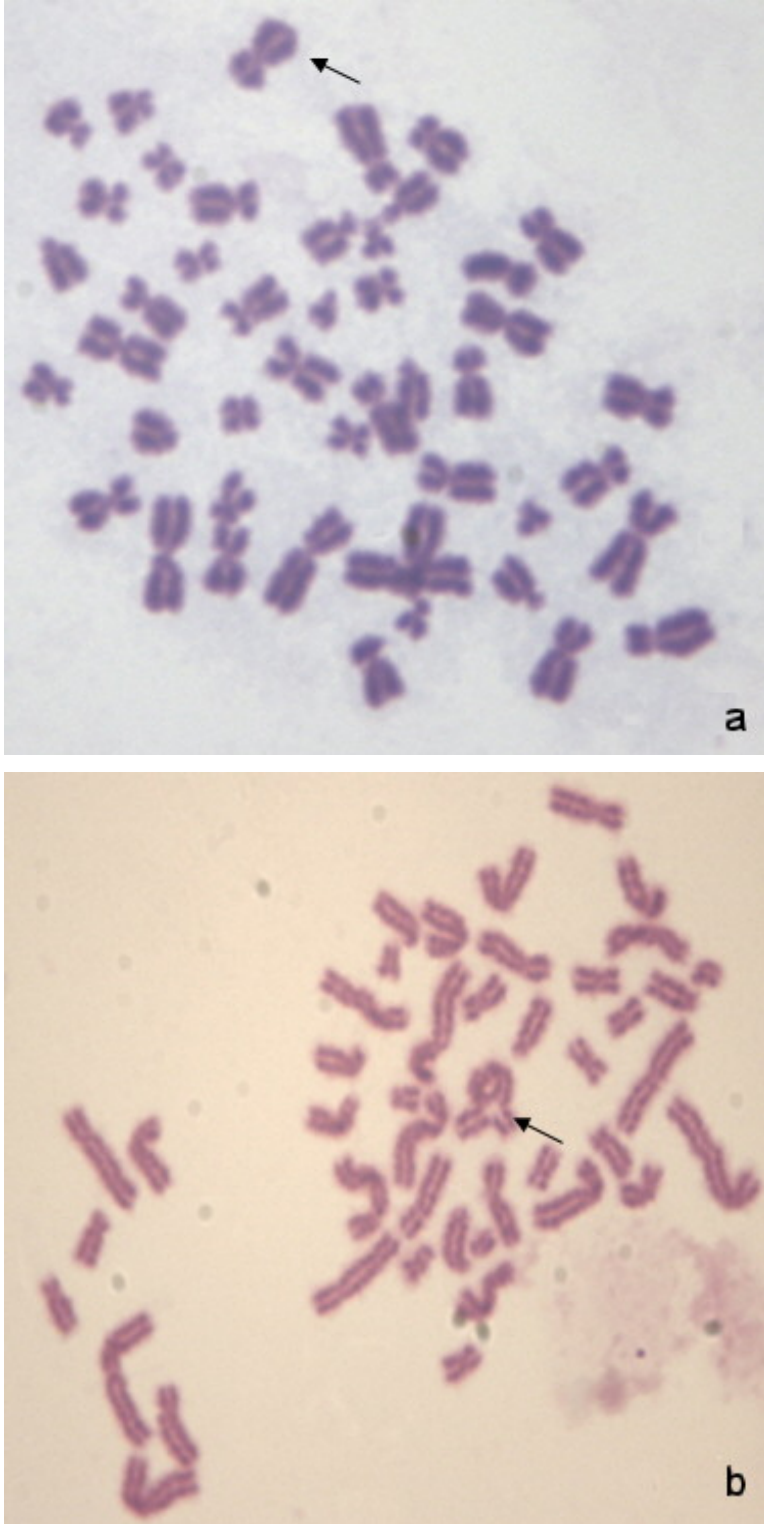
** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



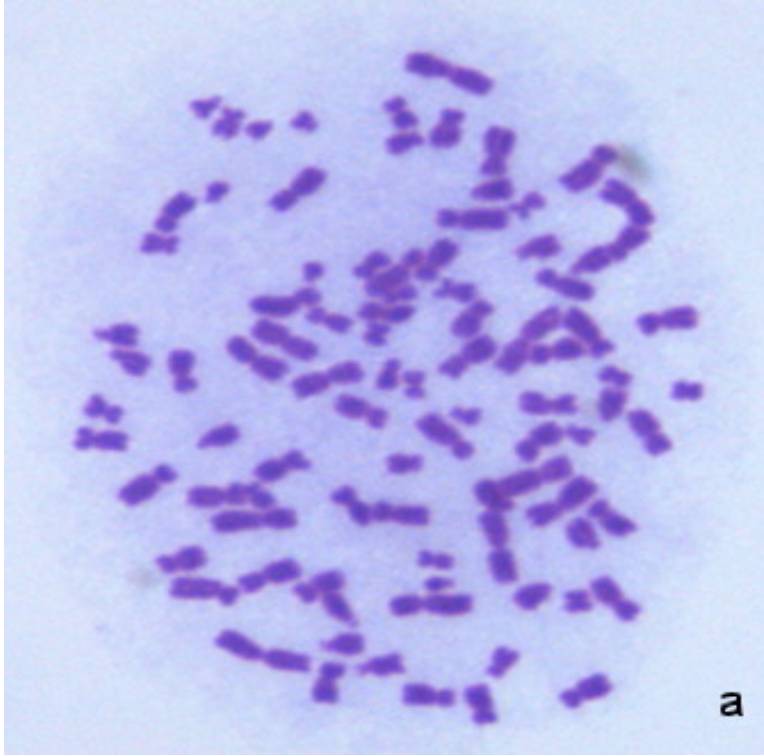
Resim 4.14. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı



Resim 4.15. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) fragment, b) disentrik kromozom



Resim 4.16. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kardeş kromatidlerde birleşme, b) kromatid değişimi



Resim 4.17. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) poliploidi

Kardeş kromatid değişim frekansı, benzoik asit uygulaması sonucunda, tüm uygulamalarda kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda artış göstermiştir. Bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,87$, 48 saatlik uygulamada $r=0,76$) (Çizelge 4.10, Resim 4.18). Minimum-maksimum KKD sayısı, 2-19 arasında değişmektedir. Benzoik asit uygulaması sonucunda, mitotik indeks tüm uygulamalarda kontrole göre doza bağlı düşüş gösterirken, bu düşüş 24 saatlik uygulamada sadece 500 $\mu\text{g/ml}$ 'de, 48 saatte ise 100, 200 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ 'de istatistiksel olarak anlamlıdır (24 saatlik uygulama için $r=-0,99$, 48 saatlik uygulama için $r=-0,96$) (Çizelge 4.10). Yapılan çalışmalarda, benzoik asidin en yüksek konsantrasyon olan 500 $\mu\text{g/ml}$ 'de replikasyon indeksini düşürdüğü, ancak bu düşüşün istatistiksel olarak önemli olmadığı belirlenmiştir.

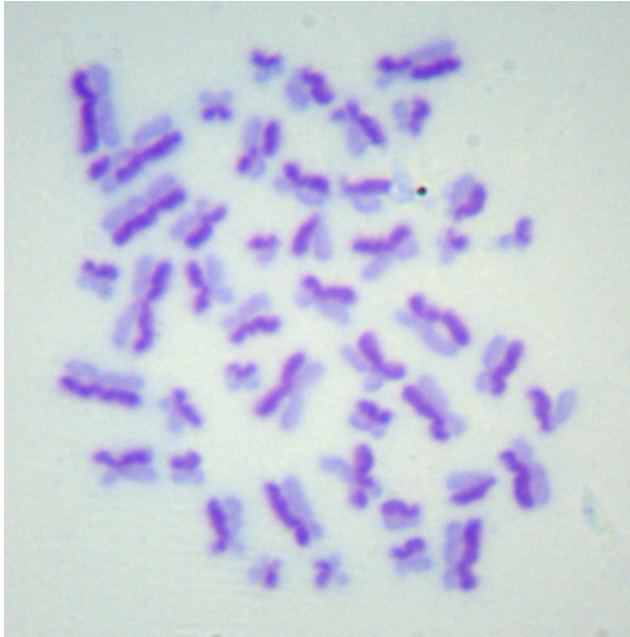
Çizelge 4.10. Benzoik asitin insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	0-7	2,80 ± 0,24	27	95	78	2,26 ± 0,048	6,10 ± 0,54
Pozitif kontrol	24	0,10	6-40	16,70 ± 1,27	83	68	49	1,83 ± 0,056	4,05 ± 0,44
Benzoik asit	24	50	2-10	4,02 ± 0,24+	38	59	103	2,33 ± 0,055	5,85 ± 0,52
		100	2-12	5,68 ± 0,34+	41	67	92	2,26 ± 0,055	5,35 ± 0,50
		200	2-13	6,62 ± 0,36+	26	64	110	2,42 ± 0,050	4,85 ± 0,48
		500	4-16	7,54 ± 0,35+	40	65	95	2,28 ± 0,055	3,60 ± 0,42**
Kontrol	48	0,00	0-6	2,88 ± 0,23	40	83	77	2,19 ± 0,053	6,80 ± 0,56
Pozitif kontrol	48	0,10	7-43	21,84 ± 1,54	80	69	51	1,86 ± 0,056	3,85 ± 0,43
Benzoik asit	48	50	2-13	6,68 ± 0,37+	34	58	110	2,40 ± 0,054	5,60 ± 0,51
		100	3-14	6,92 ± 0,39+	50	76	74	2,12 ± 0,055	4,65 ± 0,47*
		200	2-19	6,92 ± 0,39+	43	65	92	2,25 ± 0,056	4,15 ± 0,45**
		500	5-17	8,66 ± 0,40+	72	117	11	1,69 ± 0,040	2,15 ± 0,32**

+Kontrolle göre P< 0,05 düzeyinde anlamlı (t testi)

* Kontrolle göre P< 0,01 düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrolle göre P< 0,001 düzeyinde anlamlı (z testi)



Resim 4.18. Benzoik asit uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri

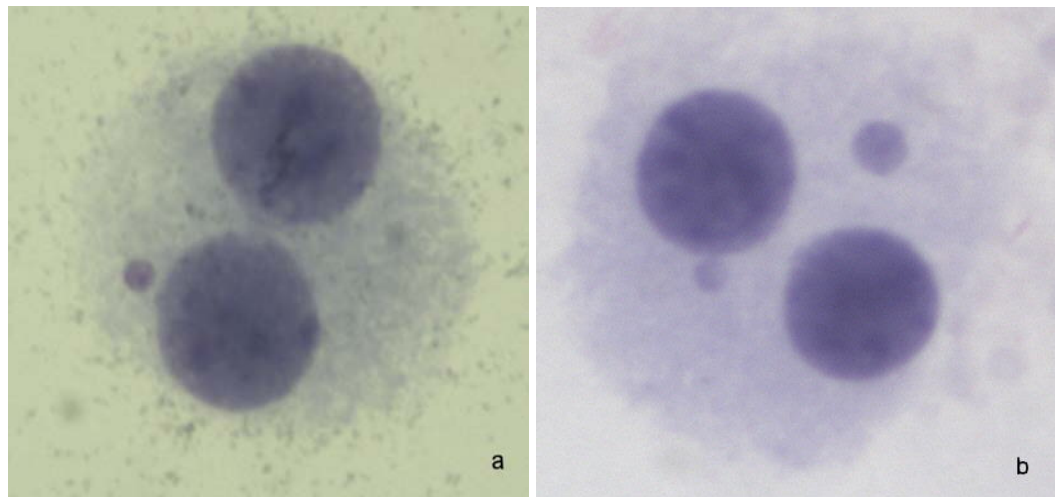
Benzoik asit uygulamasıyla mikronükleus frekanslarında da artışlar gözlenmiştir. Benzoik asit, tüm dozlarda MN frekansını artırmış fakat bu artış, sadece 200 ve 500 µg/ml’lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlıdır. Mikronükleus frekansındaki artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,79$) (Çizelge 4.11, Resim 4.19 - 4.20). Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde bir, iki ve dört mikroçekirdekli binükleatlara rastlanmıştır. Benzoik asit uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.11. Benzoik asitin insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

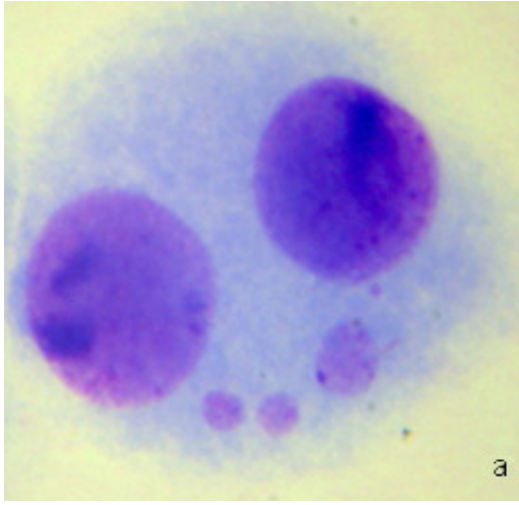
Test maddesi	Uygulama		Sayılan Binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN $\pm$ SH (%)	Nükleer bölünme indeksi $\pm$ SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	0,00	2000	4	-	-	-	0,20 $\pm$ 0,09	1,44 $\pm$ 0,38
Pozitif kontrol	48	0,10	2000	73	7	1	-	4,50 $\pm$ 0,46	1,28 $\pm$ 0,36
Benzoik asit	48	50	2000	7	1	-	-	0,45 $\pm$ 0,15	1,49 $\pm$ 0,38
		100	2000	10	-	-	-	0,50 $\pm$ 0,16	1,45 $\pm$ 0,38
		200	2000	10	2	-	2	1,10 $\pm$ 0,23**	1,45 $\pm$ 0,38
		500	2000	18	1	-	-	1,00 $\pm$ 0,22*	1,34 $\pm$ 0,36

*Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

**Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



Resim 4.19. Benzoik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir mikronükleuslu binükleat, b) iki mikronükleuslu binükleat



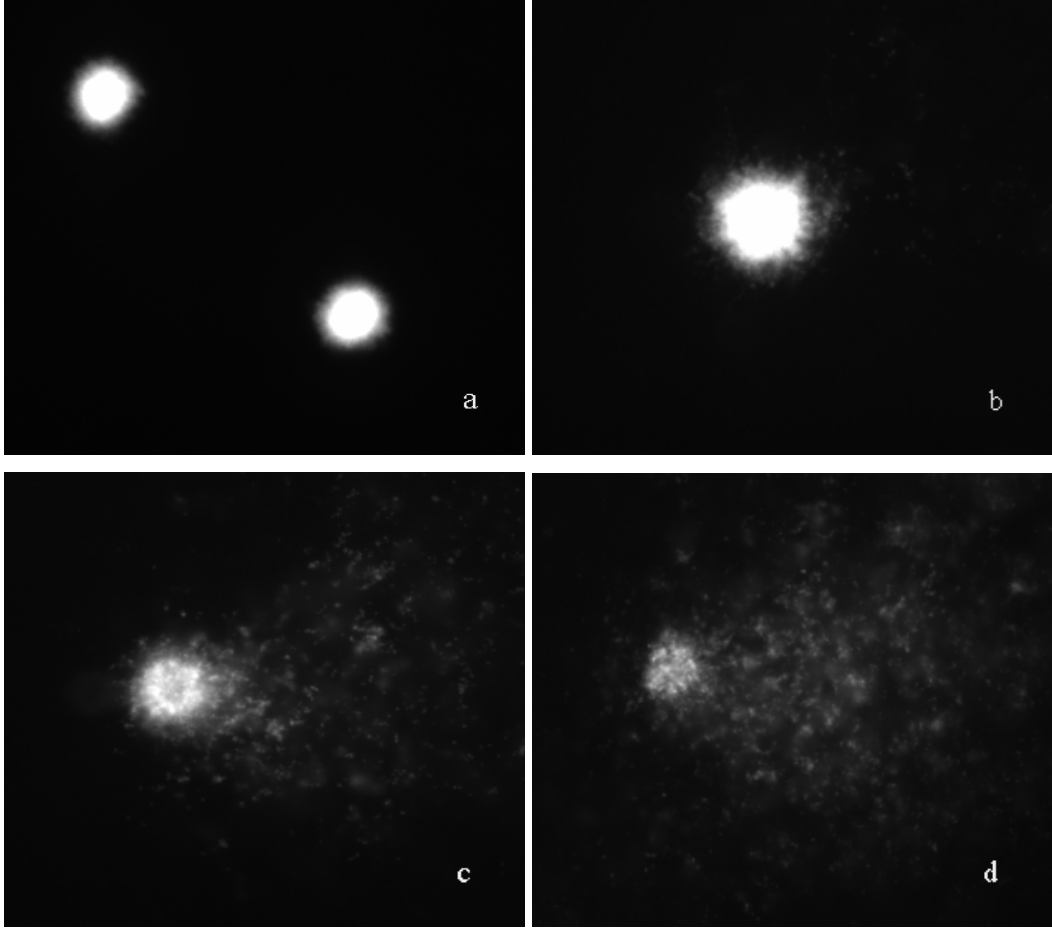
Resim 4.20. Benzoik asit uygulamasıyla uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binukleat hücreler a) dört mikronükleuslu binükleat

Benzoik asit ile yapılan komet testi sonuçlarına göre, bu maddenin DNA’da tek zincir kırıklarına neden olduğu ve kuyruktaki DNA yoğunluğunu ve kuyruk uzunluğunu kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.12, Resim 4.21).

Çizelge 4.12. Benzoik asit ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (μm)
Kontrol	0,00	5.81 ± 1.46	48.91 ± 1.82
Pozitif Kontrol	0,30	14.45 ± 1.64	68.65 ± 1.97
Benzoik asit	50	$9.83 \pm 0.99+$	$71.10 \pm 2.64+$
	100	$9.76 \pm 1.07+$	$78.12 \pm 4.41+$
	200	$9.96 \pm 1.12+$	$80.29 \pm 4.48+$
	500	$8.94 \pm 0.86+$	$70.10 \pm 2.44+$

+Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Resim 4.21. Benzoik asit ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d)  ok hasarlı DNA

4.4. Kalsiyum Propiyonat Uygulaması

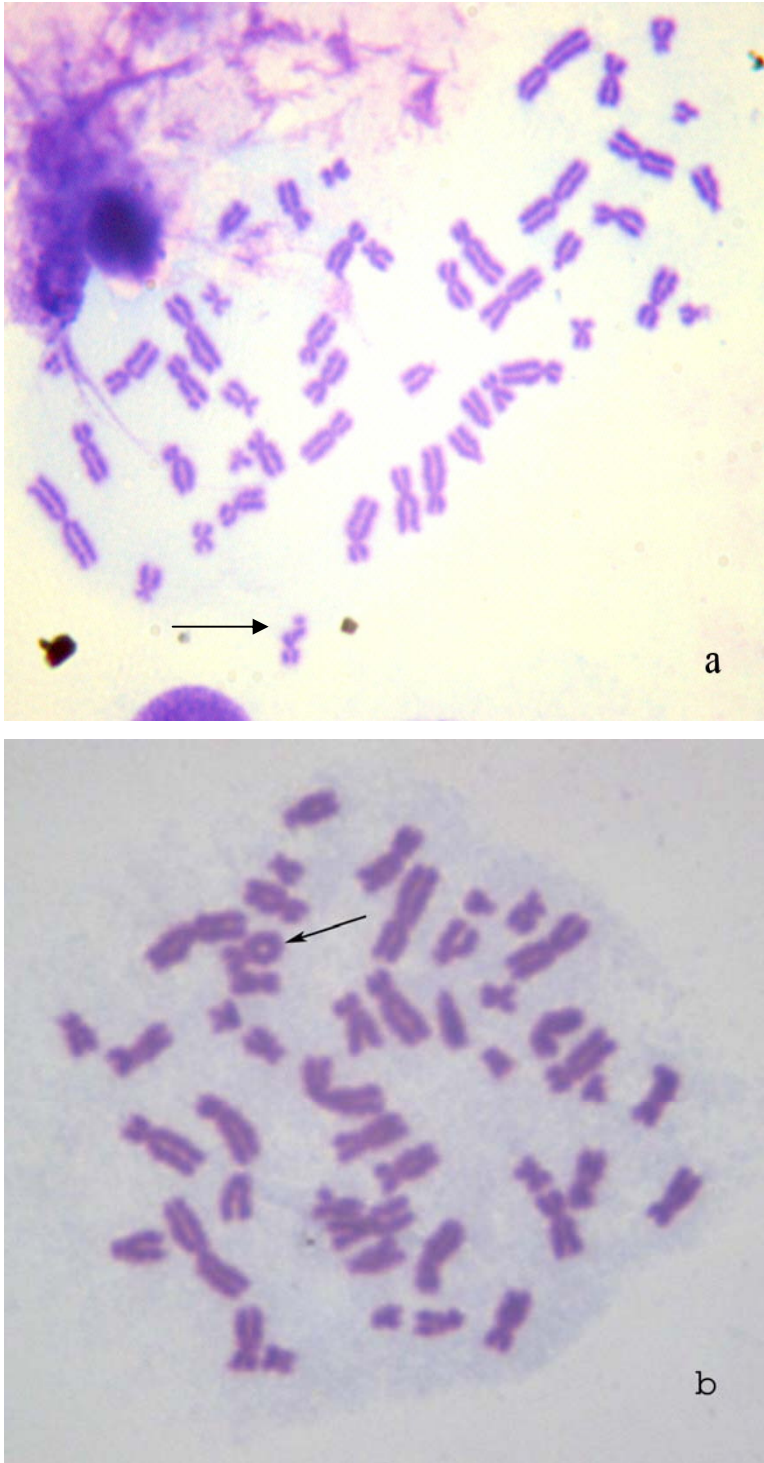
Kalsiyum propiyonat uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde toplam 6 tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlardan 5 tanesi yapısal (kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, fragment, ve pulverizasyon), 1 tanesi ise sayısal anormallik olarak değerlendirilmiştir (poliploidi) (Resim 4.22 - 4.24). Bu anormalliklerden en sık rastlanana kromatid kırığıdır. Yapılan analizler, anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,84$ ve $r=0,83$, 48 saatlik uygulamada sırasıyla $r=0,75$ ve $r=0,72$) (Çizelge 4.13).

Çizelge 4.13. Kalsiyum Propiyonat uygulaması ile periferik insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

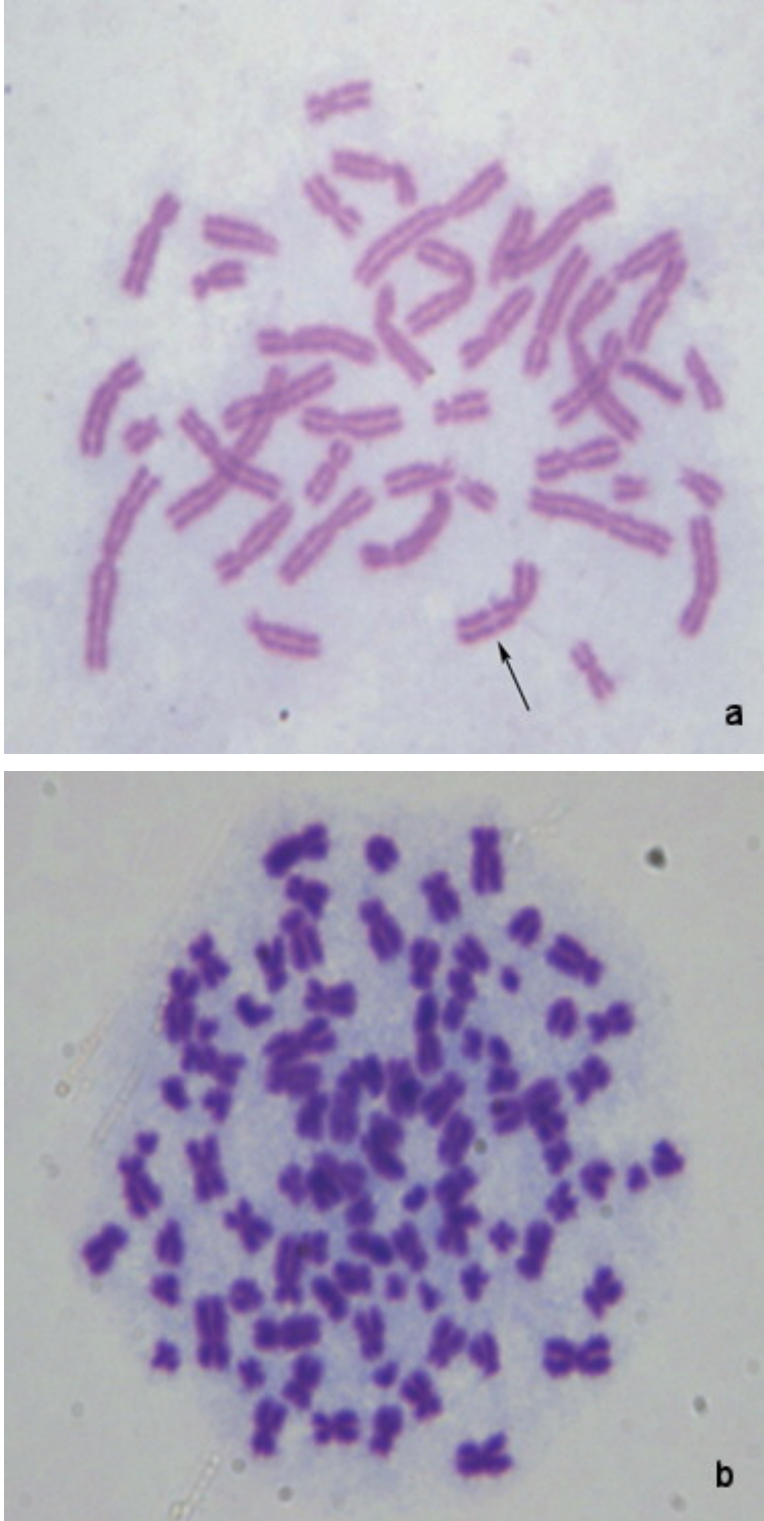
Test maddesi	Uygulama		Anormallikler							Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
			Yapısal				Sayısal				
	Süre (Saat)	Doz (µg/ml)	ktk	kzk	ktd	f	kbb	pl	p		
Kontrol	24	0,00	1	-	-	-	1	-	-	1,00 ± 0,70	0,010 ± 0,007
Pozitif kontrol	24	0,10	19	9	2	-	11	-	-	20,50 ± 2,85	0,205 ± 0,029
Kalsiyum Propiyonat	24	50	11	6	-	1	3	-	-	10,00 ± 2,12*	0,105 ± 0,022*
		100	10	1	-	2	8	-	1	12,00 ± 2,30*	0,120 ± 0,023*
		200	12	3	-	2	-	-	-	8,50 ± 1,97*	0,085 ± 0,020*
		1000	18	4	-	2	1	3	12	20,00 ± 2,83*	0,200 ± 0,028*
Kontrol	48	0,00	2	-	-	-	-	-	-	1,00 ± 0,70	0.010 ± 0,007
Pozitif kontrol	48	0,10	25	5	12	4	7	-	2	27,50 ± 3,16	0.275 ± 0,032
Kalsiyum Propiyonat	48	50	10	1	-	2	5	-	-	9,00 ± 2,02*	0.095 ± 0,021*
		100	14	1	-	-	4	-	-	9,50 ± 2,07*	0.095 ± 0,020*
		200	14	-	-	-	6	-	-	10,00 ± 2,12*	0.100 ± 0,021*
		1000	-	-	-	-	-	-	-	Toksik	Toksik

ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, ktd: kromatid değişimi, f: fragment, kbb: kardeş kromatidlerde birleşme, pl: pulverizasyon, p: poliploidi.

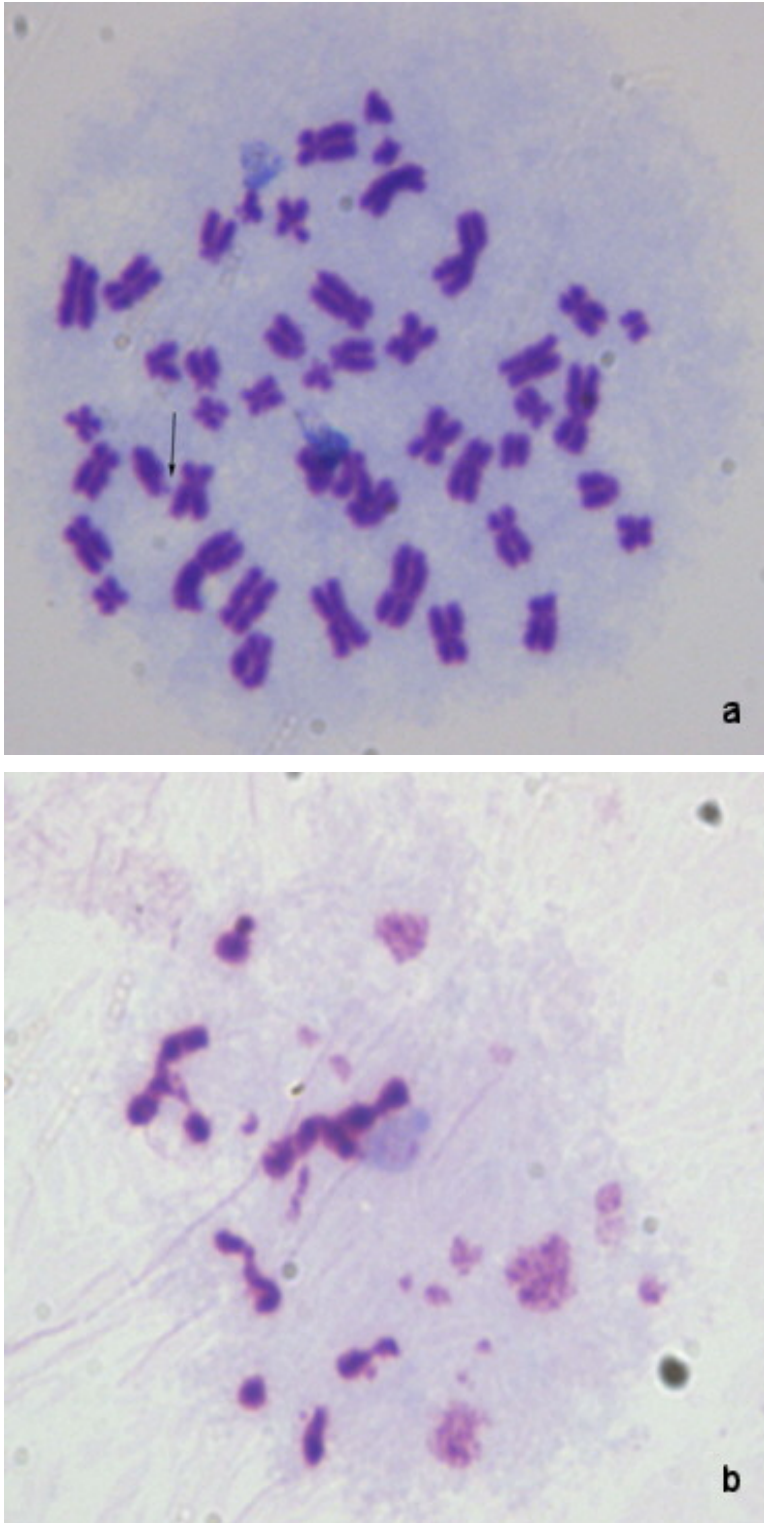
* Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Resim 4.22. Kalsiyum Propiyonat uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı, b) kardeş kromatitlerde birleşme



Resim 4.23. Kalsiyum Propiyonat uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromozom kırığı, b) poliploidi



Resim 4.24. Kalsiyum Propiyonat uygulaması ile insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) fragment, b) pulverizasyon

Kalsiyum propiyonat uygulaması, tüm muamelelerde, insan lenfositlerinde, kardeş kromatid değişim frekansını kontrole göre istatistiksel açıdan önemli oranda artırmıştır. Bu artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,75$, 48 saatlik uygulamada $r=0,77$) (Çizelge 4.14, Resim 4.25). Mitotik indeks tüm uygulamalarda kontrole nazaran, doza bağlı düşüş gösterirken (24 saatlik uygulama için $r=-0,91$, 48 saatlik uygulama için $r=-0,76$), bu düşüş 24 saatlik uygulamada sadece 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'de, 48 saatlik uygulamada ise, tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak önemli düzeydedir (Çizelge 4.14). Yapılan çalışmalarda kalsiyum propiyonatın replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir. Ayrıca 1000 $\mu\text{g/ml}$ 'lik uygulama, 48 saatte toksik etki göstermiştir, bu nedenle bölünmekte olan hücre görülememiştir.

Çizelge 4.14. Kalsiyum Propiyonatın insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min-max KKD	KKD/hücre $\pm$ SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ $\pm$ SE	Mİ $\pm$ SH (%)
	Süre (Saat)	Doz ($\mu\text{g/ml}$)							
Kontrol	24	0,00	0-8	$2,96 \pm 0,25$	27	34	139	$2,56 \pm 0,051$	$6,70 \pm 0,56$
Pozitif kontrol	24	0,10	8-25	$16,20 \pm 0,75$	90	56	54	$1,82 \pm 0,058$	$4,75 \pm 0,48$
Kalsiyum Propiyonat	24	50	2-11	$4,98 \pm 0,31+$	18	35	147	$2,65 \pm 0,045$	$6,30 \pm 0,54$
		100	2-13	$6,14 \pm 0,32+$	17	27	156	$2,70 \pm 0,044$	$5,85 \pm 0,52$
		200	3-19	$6,82 \pm 0,38+$	13	51	136	$2,62 \pm 0,043$	$5,50 \pm 0,51$
		1000	2-22	$7,92 \pm 0,46+$	64	67	69	$2,03 \pm 0,058$	$4,60 \pm 0,47^*$
Kontrol	48	0,00	0-8	$2,96 \pm 0,25$	27	34	139	$2,56 \pm 0,051$	$6,70 \pm 0,56$
Pozitif kontrol	48	0,10	22-45	$31,54 \pm 0,84$	103	54	43	$1,70 \pm 0,057$	$2,90 \pm 0,38$
Kalsiyum Propiyonat	48	50	5-11	$6,90 \pm 0,23+$	18	55	127	$2,55 \pm 0,046$	$4,55 \pm 0,47^*$
		100	5-11	$7,02 \pm 0,24+$	17	52	131	$2,57 \pm 0,046$	$4,25 \pm 0,45^{**}$
		200	5-13	$7,52 \pm 0,28+$	28	53	119	$2,46 \pm 0,052$	$4,20 \pm 0,45^{**}$
		1000	-	Toksik	-	-	-	Toksik	Toksik

+ Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

* Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Resim 4.25. Kalsiyum Propiyonat uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatid değişimleri

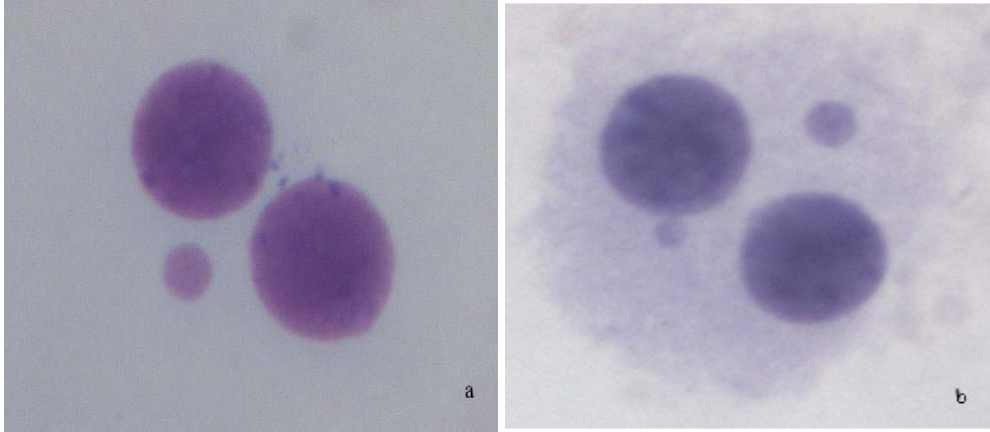
Kalsiyum propiyonat uygulaması sonucunda, insan lenfositlerinde, mikronukleus oluşumları gözlenmiştir. Mikronukleus frekansları tüm uygulamalarda kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artmıştır. Mikronukleus frekansındaki artış, doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,86$) (Çizelge 4.15, Resim 4.26). Kalsiyum propiyonat insan lenfositlerinde bir ve iki mikronukleuslu hücrelerin oluşmasına neden olmuştur. Kalsiyum propiyonat uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.15. Kalsiyum Propiyonatın insan lenfositlerinde mikronukleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan Binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronukleus frekansları			MN±SH (%)	Nükleer Bölünme İndeksi ± SH (NBI)
	Süre (Saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)		
Kontrol	48	0,00	2000	1	-	-	0,05 ± 0,05	1,80 ± 0,42
Pozitif kontrol	48	0,10	2000	81	3	-	4,35 ± 0,46	1,45 ± 0,38
Kalsiyum Propiyonat	48	50	2000	10	-	-	0,50 ± 0,16*	1,76 ± 0,42
		100	2000	10	1	-	0,60 ± 0,17*	1,67 ± 0,41
		200	2000	14	-	-	0,70 ± 0,19**	1,54 ± 0,39
		1000	2000	-	-	-	Toksik	Toksik

* Kontrole göre $P < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

** Kontrole göre $P < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



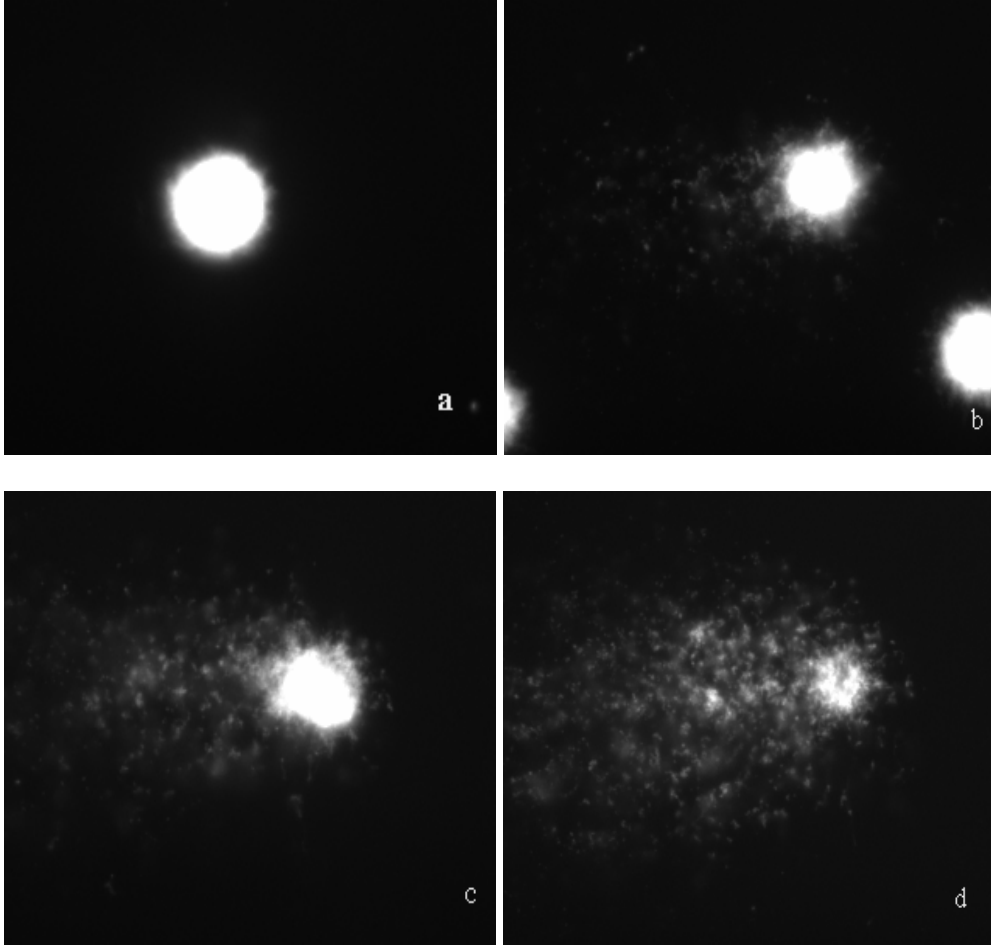
Resim 4.26. Kalsiyum Propiyonat uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir mikroçekirdekli binükleat hücre b) iki mikroçekirdekli binükleat hücre

Yapılan çalışmalar sonucunda kalsiyum propiyonatın, komet testinde primer DNA hasarını kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı belirlenmiştir. Kalsiyum propiyonat uygulamasıyla, hem kuyruktaki DNA yoğunluğu ve hem de kuyruk uzunluğu, uygulanan dozlarda önemli artış göstermiştir. Kuyruk yoğunluğundaki artış, en yüksek konsantrasyonda, pozitif kontrolden bile daha yüksek düzeydedir (Çizelge 4.16, Resim 4.27).

Çizelge 4.16. Kalsiyum Propiyonat ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test maddesi	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (μm)
Kontrol	0,00	$5,81 \pm 1,46$	$48,91 \pm 1,82$
Pozitif Kontrol	0,30	$14,45 \pm 1,64$	$68,65 \pm 1,97$
Kalsiyum propiyonat	50	$7,60 \pm 1,20$	$65,17 \pm 1,69+$
	100	$10,14 \pm 1,32+$	$55,54 \pm 1,53+$
	200	$12,75 \pm 1,81+$	$64,11 \pm 1,80+$
	1000	$16,58 \pm 2,01+$	$66,41 \pm 1,91+$

+ Kontrole göre $P < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)



Resim 4.27. Kalsiyum propiyonat ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d) çok hasarlı DNA

4.5. Sitrik Asit ve Fosforik Asit Karışımı Uygulaması

Sitrik Asit ve Fosforik Asit karışımı uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde toplam 5 tip yapısal anormalliğe rastlanmıştır. Bunlar kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, fragment ve halka kromozomdur (Resim 4.28 – 4.30). Bu anormalliklerden en sık rastlanılanı kromatid kırığıdır. Yapılan analizler anormal hücre yüzdesinin ve hücre başına düşen anormalliklerin kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli oranda arttığını ve bu artışın doza bağlı olduğunu göstermiştir (24 saatlik uygulamada $r=0,60$, 48 saatlik uygulamada $r=0,91$) (Çizelge 4.17).

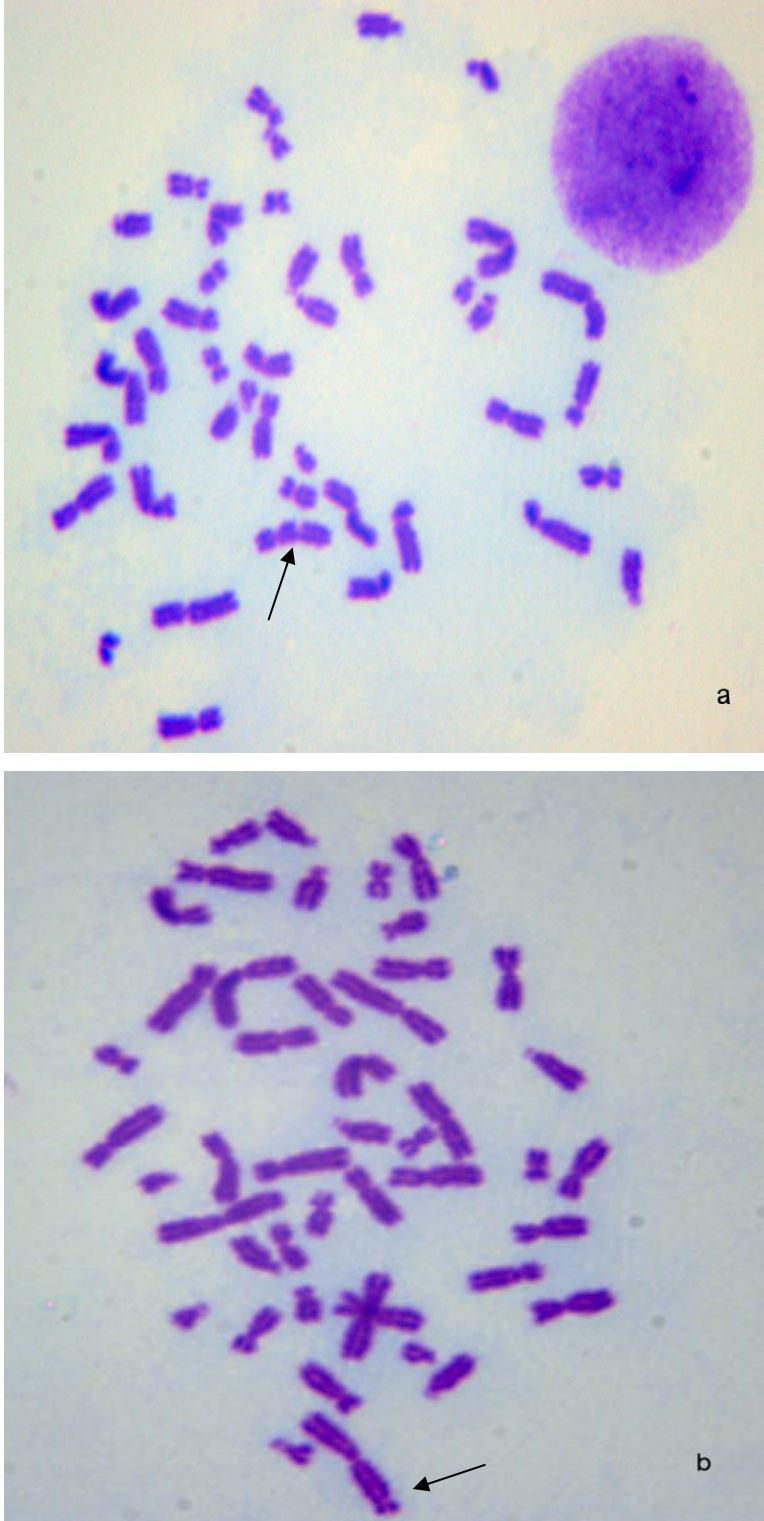
Çizelge 4.17. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler ve frekansları

Test maddesi	Uygulama		Anormallikler						Anormal hücre ± SH (%)	KA/Hücre ± SH
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)								
Kontrol	24	0,00	3	-	-	-	-	-	1,50 ± 0,86	0,015 ± 0,009
Pozitif Kontrol	24	0,10	25	11	-	7	14	-	25,00 ± 3,06	0,285 ± 0,032
SA+FA	24	25	16	2	-	4	-	-	10,00 ± 2,12**	0,110 ± 0,022**
		50	12	1	3	1	-	-	9,00 ± 2,02**	0,090 ± 0,020**
		100	15	2	-	1	-	-	8,50 ± 1,97*	0,085 ± 0,020*
		200	17	-	1	3	-	-	10,50 ± 2,17**	0,105 ± 0,022**
Kontrol	48	0,00	3	-	-	-	-	-	1,50 ± 0,86	0,015 ± 0,009
Pozitif Kontrol	48	0,10	33	20	1	7	29	-	38,50 ± 3,44	0,450 ± 0,035
SA+FA	48	25	18	-	-	2	-	-	9,50 ± 2,07**	0,100 ± 0,021**
		50	14	-	-	2	-	-	8,00 ± 1,92*	0,080 ± 0,019*
		100	14	2	-	3	-	-	9,50 ± 2,07**	0,095 ± 0,021**
		200	28	4	-	2	-	1	17,50 ± 2,69**	0,175 ± 0,027**

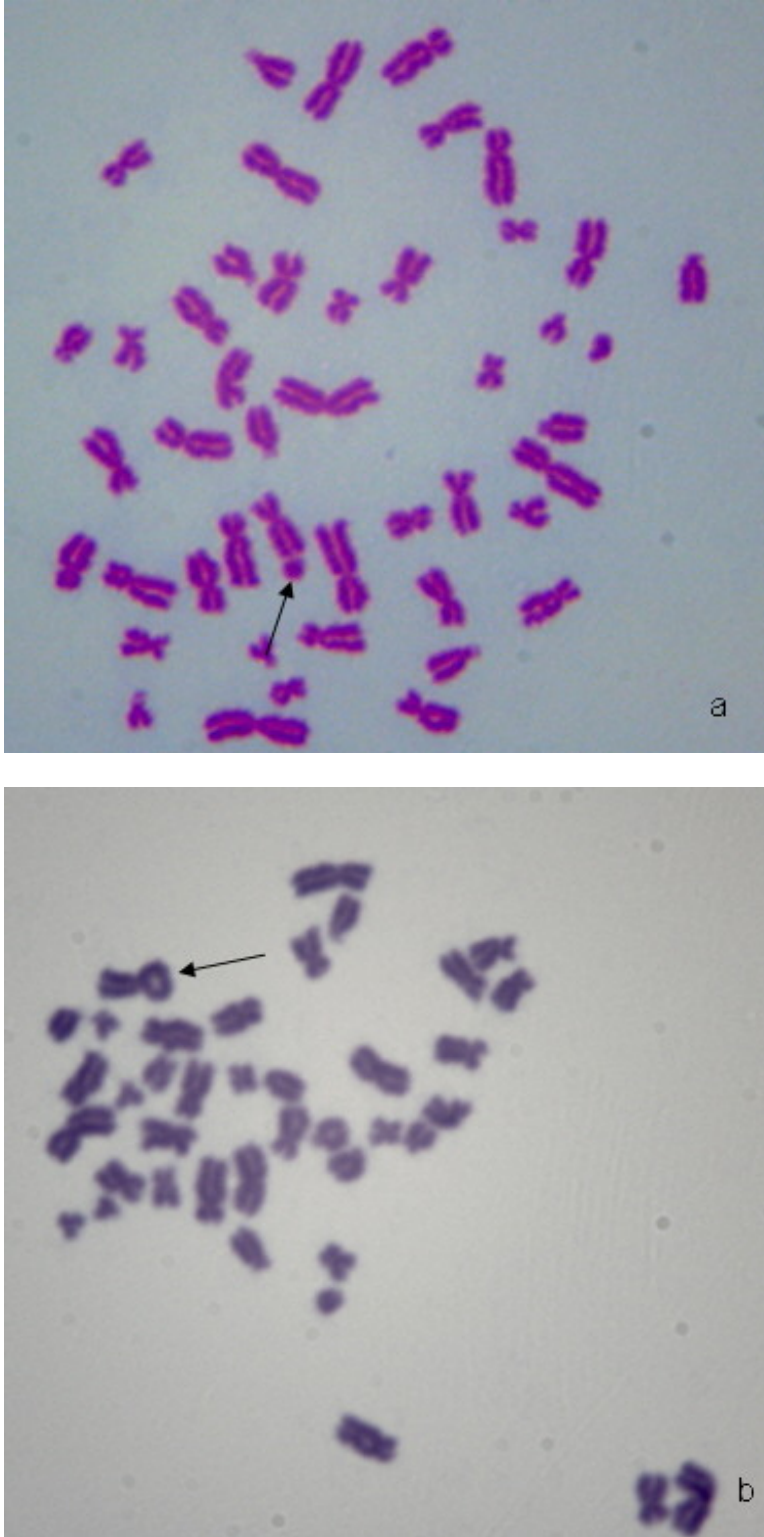
ktk: kromatid kırığı, kzk: kromozom kırığı, f: fragment, kkb: kardeş kromatidlerde birleşme, kd: kromatid değişimi, h: halka kromozom

*Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)

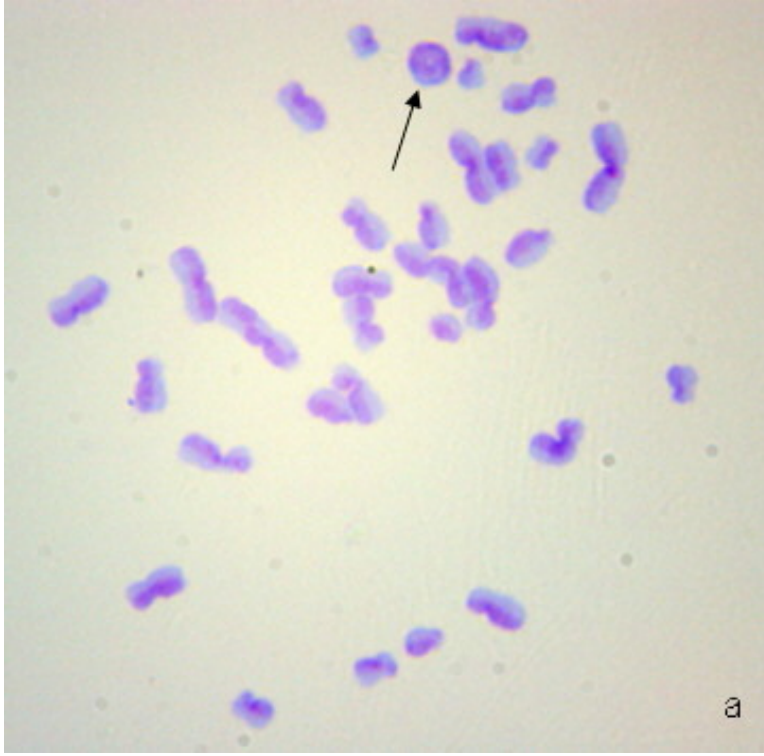
**Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Resim 4.28. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) kromatid kırığı, b) kromozom kırığı



Resim 4.29. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) fragment, b) kardeş kromatitlerde birleşme



Resim 4.30. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan kromozomal anormallikler a) halka kromozom

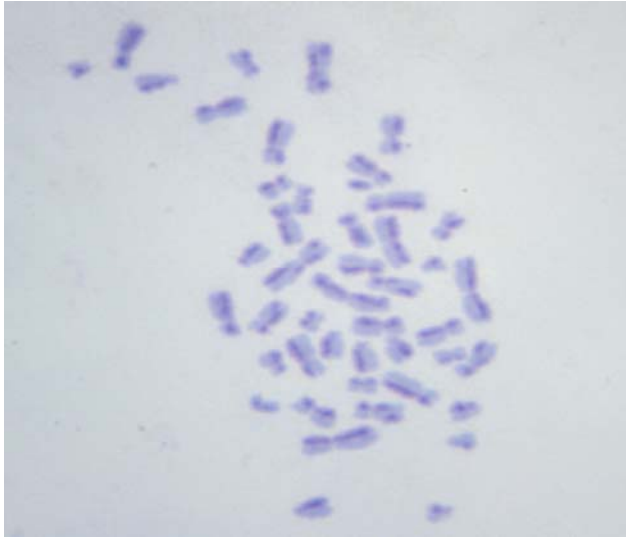
Sitrik asit ve fosforik asitin birlikte uygulanması sonucunda, kardeş kromatid değişim frekansı, tüm uygulamalarda kontrole göre istatistiksel açıdan anlamlı artış göstermiştir. Bu artış doz artışına bağlıdır (24 saatlik uygulamada $r=0,68$, 48 saatlik uygulamada $r=0,73$) (Çizelge 4.18, Resim 4.31). Sitrik asit ve fosforik asitin birlikte uygulaması, mitotik indekste de tüm uygulama grupları ve sürelerinde kontrole göre istatistiksel olarak önemli düzeyde düşüş göstermiş ve bu düşüş yine doza bağlı olarak gerçekleşmiştir (24 saatlik uygulamada $r=-0,62$ ve 48 saatlik uygulamada $r=-0,51$) (Çizelge 4.18). Yapılan çalışmalarda sitrik asit ve fosforik asitin birlikte uygulamasının replikasyon indeksini etkilemediği belirlenmiştir.

Çizelge 4.18. Sitrik asit ve fosforik asit karışımının insan lenfositlerinde KKD, Rİ ve Mİ frekansları üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Min.- maks. KKD	KKD/hücre ± SH	M ₁	M ₂	M ₃	Rİ ± SH	Mİ ± SH (%)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)							
Kontrol	24	0,00	3-11	6.18 ± 0.31	14	20	166	2.76 ± 0.040	8.15 ± 0.61
Pozitif Kontrol	24	0,10	20-36	27.76 ± 0.59	64	68	68	2.02 ± 0.058	4.60 ± 0.47
SA+FA	24	25	5-19	9.60 ± 0.46+	13	44	143	2.65 ± 0.042	5.20 ± 0.50*
		50	5-17	8.30 ± 0.33+	25	34	141	2.58 ± 0.050	3.85 ± 0.43*
		100	5-13	8.98 ± 0.32+	22	31	147	2.63 ± 0.048	4.10 ± 0.44*
		200	6-15	10.02 ± 0.35+	28	32	140	2.56 ± 0.051	4.10 ± 0.44*
Kontrol	48	0,00	3-11	6.18 ± 0.31	14	20	166	2.76 ± 0.040	8.15 ± 0.61
Pozitif Kontrol	48	0,10	24-66	44.36 ± 1.00	96	54	50	1.77 ± 0.058	3.50 ± 0.41
SA+FA	48	25	6-15	9.24 ± 0.29+	24	34	142	2.59 ± 0.049	4.90 ± 0.48*
		50	4-16	8.98 ± 0.39+	29	39	132	2.52 ± 0.052	4.85 ± 0.48*
		100	5-17	8.76 ± 0.33+	28	49	123	2.48 ± 0.052	5.00 ± 0.49*
		200	6-13	10.20 ± 0.30+	53	70	77	2.12 ± 0.057	4.95 ± 0.49*

+ Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t testi)

* Kontrole göre $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı (z testi)



Resim 4.31. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulaması ile insan periferik lenfositlerinde oluşan kardeş kromatit değişimleri

Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasıyla mikronükleus frekansları kontrole göre tüm uygulamalarda istatistiksel olarak önemli düzeyde artmıştır. Mikronükleus frekansındaki artış doza bağlı olarak gerçekleşmiştir ($r=0,89$) (Çizelge 4.19, Resim

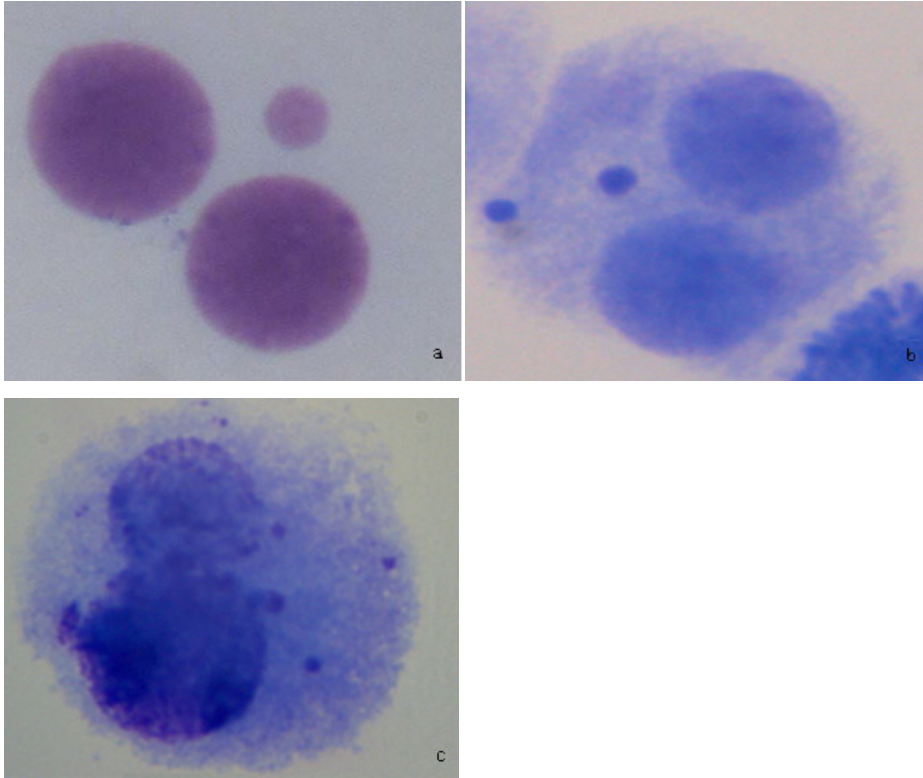
4.32). Sitrik asit ve fosforik asit, insan lenfositlerinde bir, iki ve dört mikronükleuslu binükleatların oluşmasına neden olmuştur. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasının nükleer bölünme indeksi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.19. Sitrik asit ve fosforik asit karışımının insan lenfositlerinde mikronükleus frekansları ve nükleer bölünme indeksi üzerine etkisi

Test maddesi	Uygulama		Sayılan binükleat hücre sayısı	BN hücreler içinde mikronükleus frekansları				MN±SH (%)	Nükleer bölünme indeksi±SH (NBI)
	Süre (saat)	Doz (µg/ml)		(1)	(2)	(3)	(4)		
Kontrol	48	0,00	2000	5	-	-	-	0,25 ± 0,11	1.96 ± 0.44
Pozitif kontrol	48	0,10	2000	42	4	4	-	3,10 ± 0,39	1.08 ± 0.33
SA+FA	48	25	2000	12	2	-	-	0,80 ± 0,20*	1.55 ± 0.39
		50	2000	8	1	-	1	0,70 ± 0,19*	1.70 ± 0.41
		100	2000	9	-	-	-	0,60 ± 0,17*	1.67 ± 0.41
		200	2000	29	3	-	-	1,75 ± 0,29**	1.75 ± 0.41

* Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (z-testi)

** Kontrole göre $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı (z-testi)



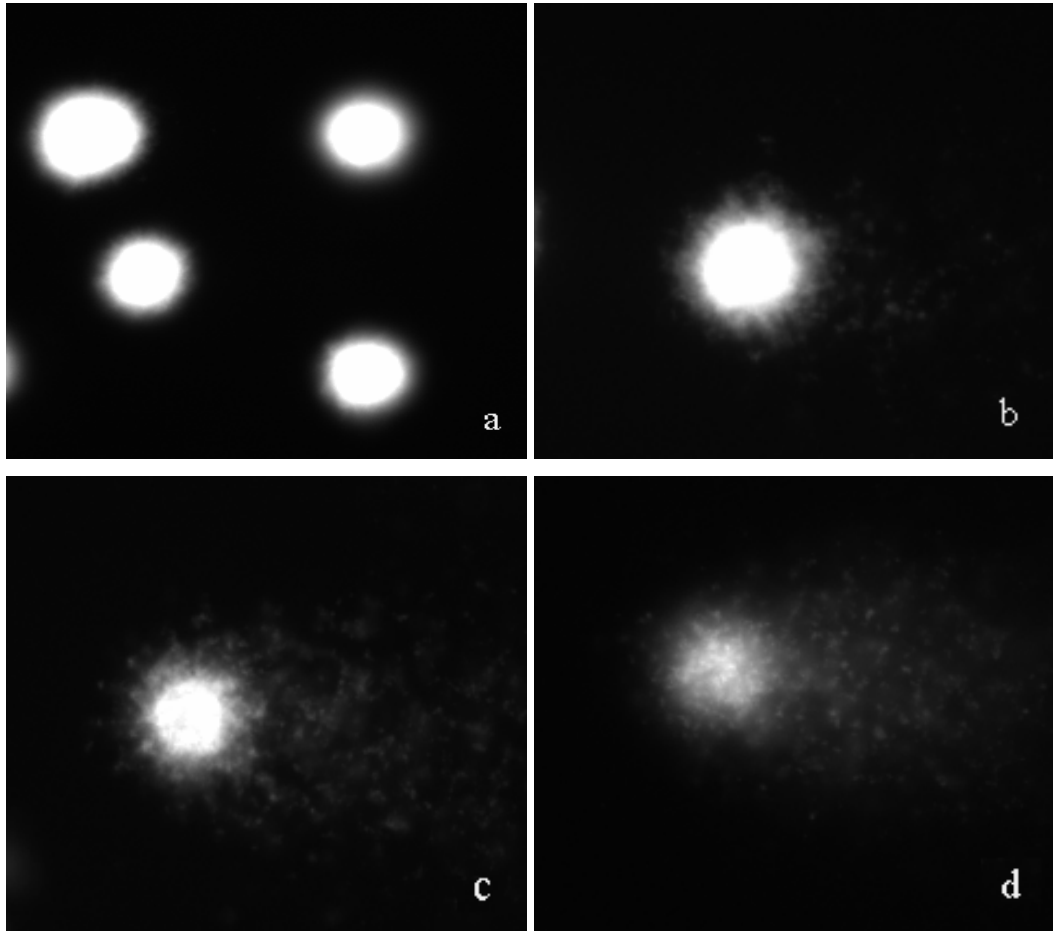
Resim 4.32. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasıyla insan lenfositlerinde oluşan mikronükleuslu binükleat hücreler a) bir MN'li binükleat b) iki MN'li binükleat c) dört MN'li binükleat

Sitrik asit ve fosforik asit karışımı uygulamasıyla, izole edilmiş insan lenfositlerinde komet kuyruğundaki DNA yoğunluğu kontrole göre tüm dozlarda anlamlı artış göstermiştir (Resim 4.33). Bu artış özellikle en yüksek konsantrasyonda pozitif kontrolden daha da fazla olmuştur. Komet kuyruk uzunluğundaki artış ise 100 ve 200 $\mu\text{g/ml}$ 'lik dozlarda önemli düzeydedir. Artış düzeyi, bu iki konsantrasyonda da pozitif kontrolden daha fazla olarak ortaya çıkmıştır (Çizelge 4.20).

Çizelge 4.20. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı ile 1 saat uygulama sonucunda insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarı

Test Maddesi	Doz ($\mu\text{g/ml}$)	Kuyruk yoğunluğu (%)	Kuyruk uzunluğu (μm)
Kontrol	0,00	$5,81 \pm 1,46$	$48,91 \pm 1,82$
Pozitif Kontrol	0,30	$14,45 \pm 1,64$	$68,65 \pm 1,97$
Sitrik Asit + Fosforik Asit	25	$6,95 \pm 0,90+$	$54,69 \pm 2,58$
	50	$7,33 \pm 1,23+$	$53,31 \pm 1,55$
	100	$20,40 \pm 1,72+$	$96,43 \pm 4,41+$
	200	$38,21 \pm 3,04+$	$86,31 \pm 3,49+$

+ Kontrole göre $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı (t-testi)



Resim 4.33. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı ile muamele edilen izole insan lenfositlerinde oluşan DNA hasarlarının komet testi ile görünümü a) hasarsız DNA, b) az hasarlı DNA, c) orta hasarlı DNA, d) çok hasarlı DNA

5. TARTIŞMA

Gıda katkı maddeleri son yıllarda, ev yapımı olmayan hazır gıdalarda yoğun olarak kullanılan maddelerdir. Gıdalarda antioksidan, antimikrobiyal ya da buna benzer birçok amaç için kullanılması ve günümüz insanının hazır yiyeceğe olan düşkünlüğü nedeniyle doğumdan ölüme kadar maruz kalınan bu maddelerin, insanlarda uzun süreli tüketime bağlı olarak oluşturabileceği yan etkiler oldukça önem kazanmıştır. Nitekim bazı katkı maddelerinin kullanımı, toksik ve karsinojenik özellikleri nedeniyle çeşitli ülkelerde yasaklanmıştır. Örneğin AF-2 (2-[2-furyl]-3-[5-nitro-2-furyl] acrylamide) ile yapılan çalışmalar sonucunda, bakteri ve insan hücrelerinde DNA hasarına ve yine bakteri, mantar, böcek ve insan hücrelerinde mutasyonlara ve memeli hücrelerinde kromozomal anormalliklere neden olduğu için 1965 yılında Japonya'da, son zamanlarda da tüm dünyada kullanımı yasaklanmış olan bir maddedir [IARC, 1983]. Yine butter yellow (p-dimethylamino-azobenzene-azo bileşiği) deney hayvanlarında göstermiş olduğu karsinojenik özellikleri nedeniyle önce ABD'de ardından da Avrupa'da yasaklanmış olan bir gıda katkı maddesidir [IARC, 1975]. Çeşitli kimyasalların karsinojenik özelliklerinin belirlenmesinde genotoksisite çalışmaları çok fazla tercih edilmektedir. DNA'da hasar oluşturan etki olarak da isimlendirilen genotoksik etki, kanser başlatıcı bir mekanizma olarak kabul edilmekte, bu nedenle de geliştirilen çeşitli yöntemler ile DNA'daki hasarın saptanması kanser riskinin belirlenmesinde yardımcı olabilmektedir [Salama ve ark., 1999].

Bu çalışmada, gıda katkı maddelerinin bu kadar yoğun kullanılması ve bazılarının karsinojenik ve toksik etki göstermeleri nedeniyle, günlük yaşantımızda çok kez maruz kaldığımız ve daha önce insan lenfositlerinde genotoksisiteleri ile ilgili herhangi bir çalışma yapılmayan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın *in vitro* genotoksik etkileri incelenmiştir.

Bu çalışmada sitrik asit, uygulanan tüm konsantrasyon ve sürelerde kromozomal anormallik frekansını kontrole göre anlamlı oranda artırmıştır. Sitrik asit insan lenfositlerinde 7 tip anormalliğe neden olmuştur. Bunlar kromatit ve kromozom

kırıkları, kardeş kromatitlerde birleşme, fragment, disentrik kromozom, poliploidi ve endoreduplikasyondur. Bu anormalliklerden en sık rastlanılanı kardeş kromatitlerde birleşmedir.

Fosforik asit, 24 saatlik uygulamanın 25 µg/ml'lik konsantrasyonu haricinde, tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarında, anormallik frekansında kontrole göre anlamlı artışlara sebep olmuştur. Fosforik asit uygulamasıyla insan lenfositlerinde 5 tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlar kromatit ve kromozom kırıkları, kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozom ve poliploididir. Bu anormalliklerden en sık rastlanılanı kromatit kırığıdır.

Benzoik asit, tüm uygulama konsantrasyonları ve sürelerinde kontrole göre kromozomal anormallik frekansını istatistiksel olarak önemli düzeyde artırmıştır. Benzoik asit ile yapılan uygulama sonucunda, insan lenfositlerinde toplam 7 tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlar kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, kromatid değişimi, fragment, disentrik kromozomlar ve poliploididir. Bu anormalliklerden en sık rastlananları kromatid kırığıdır.

Kalsiyum propiyonat da insan lenfositlerinde kromozomal anormalliklerin frekansını artırmıştır. Bu artış, uygulanan tüm konsantrasyon ve sürelerde anlamlı düzeydedir. Kalsiyum propiyonat uygulaması sonucunda insan lenfositlerinde toplam 6 tip anormalliğe rastlanmıştır. Bunlar kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, fragment, pulverizasyon ve poliploididir. Kromatid kırığı, en çok gözlenen anormallik tipidir.

Bu çalışmada, yukarıda verilen gıda katkı maddelerinin tek tek uygulanmasına ilave olarak, gıdalarda sıklıkla birlikte kullanılabilen ya da maruziyetin birlikte en fazla olabildiği maddeler olan sitrik asit ve fosforik asitin, insan lenfositlerinde birlikte etkisi de incelenmiştir. Sitrik asit ve fosforik asitin birlikte uygulaması, tüm konsantrasyon ve sürelerde kromozomal anormalliklerin oluşumunda anlamlı artışa neden olmuştur. Bu maddeler 5 tip anormalliğe sebep olmuştur. Bunlar kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatidlerde birleşme, fragment ve halka

kromozomdur. Bu uygulama sonucunda en çok gözlenen anormallik kromatid kırığıdır.

Bu çalışmada, kromozom anormallikleri testi ile elde edilen sonuçlar, kullanılan katkı maddelerinin tamamının insan lenfositlerinde, besiyeri ortamının pH'sını değiştirmeden, kromozomal anormalliklerde önemli artışlara neden olduğunu göstermiştir. Kültüre alınmış insan lenfositlerinde çeşitli fiziksel ve kimyasal ajanlarla oluşan kromozomal anormalliklerin belirlenmesi oldukça önemlidir. Zira hücrelerde ortaya çıkan kromozomal anormalliklerin kanser gelişiminde erken haberci rolü oynadığı bilinmektedir [Bonassi ve ark. 1995, Hagmar ve ark. 1998]. Çalışma sırasında en fazla görülen anormallikler kromatit kırıklarıdır. Kromatit kırıkları, DNA'da meydana gelen çift zincir kırıkları sonucunda oluşan ve tek bir kromatitte gözlenen kırıklardır. Kromatit kırıkları uygulanan maddelerin çoğunlukla geç S veya G₂ aşamasında etkili olduğunu göstermektedir [Natarajan, 2002]. Bu çalışmada kullanılan katkı maddelerinin en fazla neden olduğu ikinci anormallik tipi kardeş kromatitlerde birleşmedir. Bu anormallik kromozom kolları arasında karşılıklı birleşme olarak gözlenir ve çoğunlukla kromozom uçlarında meydana gelen terminal delesyonlar sonucunda oluşabilir [Kayraldız ve Topaktaş, 2001; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006]. Çalışmada tüm maddeler tarafından oluşturulan bir diğer anormallik tipi kromozom kırıklarıdır. Kromozom kırıkları, kromozomların her iki kolunda da gözlenen tamir edilmemiş çift zincir kırıklarıdır [Savage, 1993]. Fosforik asit uygulaması dışında, diğer maddelerin tamamı fragment oluşumuna neden olmuştur. Fragmentlerin, kromozom ya da kromatitlerde meydana gelen kırılmalar ile genellikle terminal delesyonlar sonucunda oluştuğu bilinmektedir [Kayraldız ve Topaktaş, 2001; Yılmaz ve ark., 2008]. Disentrik kromozomlar, kalsiyum propiyonat dışında, kullanılan tüm maddeler tarafından oluşturulan bir anormallik tipidir. Disentrik kromozomlar, iki kromozom kolu arasındaki füzyon sonucu oluşan translokasyonlarla meydana gelmektedir. Disentrik kromozomlar, non-homolog kromozom kolları arasındaki füzyon ile veya homolog kromozomların iki kısa yada iki uzun kolu arasındaki füzyon ile gerçekleşebilmektedir [Andersen ve Pedersen-Bjergaard, 2000].

Sitrik asit ve fosforik asit karışımının uygulaması dışında diğer tüm maddeler poliploid hücre oluşumlarına neden olmuştur. Poliploidi, haploid kromozom komplementinin ikiden fazla katlarda görülmesiyle ortaya çıkmaktadır [Topaktaş ve Speit, 1990]. Poliploidi, uygulanan maddelerin iğ ipliği sisteminde de anormal etkilere neden olduklarını göstermektedir. Kromatit değişimi, sitrik asit ve benzoik asit uygulamalarında gözlenen bir anormalliktir. Tipik olarak triradiyal veya quadriradiyal olarak gözlenmekte olan kromozomlar arası değişimlerdir [Satoh ve ark., 2002; Yılmaz ve ark., 2008]. Halka kromozom, sadece sitrik asit ve fosforik asit karışımının uygulamasında gözlenen bir anormalliktir. Halka kromozomlar, kromozomların her iki uçlarında meydana gelen terminal delesyonlar sonucunda yapışkan hale dönüşen uçların birbiriyle birleşmesi ile meydana gelmektedir. Pulverizasyon sadece kalsiyum propiyonat uygulamasında rastlanan bir anormalliktir. Özellikle en yüksek doz olan 1000 µg/ml’de çok miktarda gözlenmiştir. Kromozom pulverizasyonu, interfaz nükleusu senkronize olmayan bir şekilde mitoza girmişse ortaya çıkmaktadır. Kromozom fragmentleri ya da geri kalmış kromozomların pulverizasyona neden olabileceği bildirilmiştir [Ikeuchi ve Matsui, 1974]. Dört kromatit içeren diplokromozomlar olarak da isimlendirilen endoreduplikasyon, sadece sitrik asit uygulamasında gözlenmiştir. Bu anormallik kromatid ayrılması olmaksızın ardarda iki DNA replikasyonunu takiben ortaya çıkmaktadır. Endoreduplikasyonun oluşmasında iğ ipliklerinin bozulması ve DNA’da meydana gelen hasarlar önemli rol oynamakla birlikte, mitoz bölünmede anafazda kromatid ayrılmasında önemli görev alan DNA topoizomazlarda meydana gelebilecek bozukluklar da endoreduplikasyonun ortaya çıkmasına neden olmaktadır [Cortes ve Pastor, 2003].

Farklı katkı maddeleri ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır. Antimikrobiyal bir madde olarak kullanılan sodyum metabisülfid, insan lenfositlerinde kromozom anormalliği frekansını kontrole göre önemli oranda artırmış ve kromatit ve kromozom kırıkları, kardeş kromatitlerde birleşme, kromatid değişimi, poliploidi ve endoreduplikasyon gibi anormalliklerin oluşmasına neden olmuştur [Rencüzoğulları ve ark., 2001a]. Tatlandırıcı olarak kullanılan maltitol, insan lenfositlerinde kromozomal anormallik frekansını kontrole göre artırmıştır.

Ancak bu artış, sadece 2,5 µg/ml’lik konsantrasyonda anlamlı iken, diğer konsantrasyonlarda anlamlı değildir. Tatlandırıcı olarak kullanılan aspartam, insan lenfositlerinde kromozom anormalliği frekansını kontrole göre tüm dozlarda (500, 1000 ve 2000 µg/ml) ve sürelerde (24 ve 48 saat) doza bağlı olarak artırmıştır. Aspartam, insan lenfositlerinde kromatit kırığı, kromozom kırığı, kardeş kromatitlerde birleşme, disentrik kromozom, tek kromatit birleşmesi ve poliploidiye neden olmuştur [Rencüzoğulları ve ark., 2004]. Arslan (2004), gıdalarda antimikrobiyal bir madde olarak kullanılan borik asitin 24 saatlik uygulamasının 400 µg/ml’lik konsantrasyonu dışında 600, 800 ve 1000 µg/ml’lik konsantrasyonlarda tüm uygulama sürelerinde kromozomal anormallik frekansını doza bağlı olarak artırdığını belirlemiştir. Borik asit, insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom kırıkları, kardeş kromatid birleşmesi, kromatid değişimi ve poliploidi gibi anormalliklerin ortaya çıkmasına neden olmuştur [Arslan, 2004]. Maltitol, insan lenfositlerinde kromatid ve kromozom tipi anormalliklerin oluşumuna neden olmuştur [Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006]. Kaya ve Topaktaş (2007), ağartıcı olarak kullanılan potasyum bromatın, insan lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik sürelerde ve tüm konsantrasyonlarda, kromozom anormalliği frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırdığını belirlemişlerdir. Bu artış pozitif kontrol olarak kullanılan MMC’nin neredeyse 2 katı kadar gözlenmiştir. Potasyum bromat insan lenfositlerinde kromatit ve kromozom tipinde anormalliklerin artışına neden olmuştur [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Rencüzoğulları ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan bifenilin insan lenfositlerinde kromozom anormallik frekansını kontrol ve çözücü kontrole göre tüm dozlarda (10, 30, 50 ve 70 µg/ml) önemli oranda artırdığını belirlemişlerdir. Araştırmacılar bu maddenin kromatid ve kromozom tipinde birçok yapısal anormalliğe sebep olduğunu belirtmişlerdir [Rencüzoğulları ve ark., 2008]. Yavuz-Kocaman ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfitin insan lenfositlerinde 25, 50, 100 ve 200 µg/ml’lik konsantrasyonlarda kromozom anormalliği frekansını kontrole göre önemli düzeyde artırdığını belirtmişlerdir [Yavuz-Kocaman ve ark., 2008].

Bu çalışmada kullanılan gıda katkı maddelerin tamamı, insan lenfositlerinde kardeş kromatid değişimlerinin frekansında artışlara neden olmuştur. Sitrik asit, 24 saatlik

uygulamada, 50 µg/ml hariç diğer tüm dozlarda KKD frekansını önemli oranda artırmıştır. 3000 µg/ml'lik doz, 24 ve 48 saatlik uygulamalarda toksik etki göstermiştir. Fosforik asit, KKD frekansını tüm doz ve sürelerde kontrole göre önemli düzeyde artırmıştır. Bu artış 24 saatlik uygulamada, 100 ve 200 µg/ml'lik dozlarda, kontrole göre 2 kat, 48 saatte 25, 50 ve 100 µg/ml'de 2, en yüksek doz olan 200 µg/ml'de 3 kat şeklinde gözlenmiştir. Benzoik asit, KKD'yi tüm dozlarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı miktarda artırmıştır. 24 saatlik uygulamada 100, 200 ve 500 µg/ml'de kontrole göre 2 kattan fazla, 48 saatlik uygulamada tüm dozlarda hemen hemen 3 kattan fazla KKD indüklemesi gözlenmiştir. Kalsiyum propiyonat, kontrole göre tüm dozlarda kardeş kromatid değişimi frekansını önemli oranda artırmıştır. Bu artış, 24 saatlik uygulamada, 50 µg/ml hariç, diğer tüm dozlarda kontrole göre 2 kattan fazla gözlenmiştir. 1000 µg/ml'lik doz, 48 saatlik uygulamada toksik olarak bulunmuştur. Sitrik asit ve fosforik asitin karışımı da, kardeş kromatid değişimi frekansını kontrole göre tüm konsantrasyonlarda anlamlı düzeyde artırmıştır. Kardeş kromatit değişimi, çeşitli kimyasal maddelerin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde kullanılan ve duyarlılığı yüksek olan sitogenetik bir testtir. Özellikle DNA'da çapraz bağlanmalara yol açan ajanlar, kardeş kromatit değişimi frekansını artırmaktadır. Kardeş kromatit değişiminin oluşum mekanizmasında, DNA tek zincir kırıkları etkin bir rol oynamaktadır. Bununla birlikte, DNA tek zincir kırıklarının önlenmesinde görev alan XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerde meydana gelen anormallikler de kardeş kromatit değişimine neden olabilmektedir [Wilson III ve Thompson, 2007].

Gıda katkı maddeleri ile yapılan sitogenetik araştırmalarda KKD testi yaygın olarak kullanılmaktadır. Rencüzoğulları ve ark. (2001a), antimikrobiyal bir madde olan sodyum metabisülfite 24 ve 48 saatlik sürelerde 75, 150 ve 300 µg/ml'lik konsantrasyonlarda kardeş kromatid değişimi frekansını önemli oranda artırdığını belirtmişlerdir [Rencüzoğulları ve ark., 2001a]. Un ağartıcısı olarak kullanılan potasyum bromat, insan lenfositlerinde 24 ve 48 saatlik uygulamalarda 400, 450, 500 ve 550 µg/ml'lik dozlarda kardeş kromatit değişimi frekansını kontrole göre artırmış, ancak bu artış sadece 48 saatlik uygulamada istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Borik asit, insan lenfositlerinde KKD frekansını sadece 48 saatlik uygulamada

artırmış, ancak bu artış istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır [Arslan, 2004]. Antimikrobiyal bir katkı maddesi olarak kullanılan 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene'in insan lenfositlerinde yüksek dozlarda S9'suz ortamda KKD frekansını az miktarda etkilediği belirlenmiştir [Borroto ve ark., 2004]. Rencüzoğulları ve ark. (2004), tatlandırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesi olan aspartamın, 24 ve 48 saatlik sürelerde insan lenfositlerinde KKD frekansını kontrole göre önemli bir oranda etkilemediğini bildirmişlerdir [Rencüzoğulları ve ark., 2004]. Yapay tatlandırıcı olarak kullanılan Maltitolün 1,25, 2,5 ve 5 µg/ml'lik dozları, 24 ve 48 saat süreler ile insan lenfositlerine uygulanmış ve bu maddenin KKD frekansını istatistiksel olarak önemli düzeyde artırdığı tespit edilmiştir [Rencüzoğulları ve ark., 2006]. Mpountoukas ve ark. (2008), antimikrobiyal katkı maddeleri olan potasyum sorbat, sodyum benzoat ve potasyum nitritin sitogenetik etkilerini, insan lenfositlerinde incelemişlerdir. Araştırmacılar potasyum sorbatın 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarda, sodyum benzoatın ise 8 mM'lık konsantrasyonda KKD frekansını kontrole göre önemli miktarda artırdığını belirlemişlerdir. Potasyum nitritin ise kullanılan konsantrasyonlarda herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir [Mpountoukas ve ark., 2008]. Rencüzoğulları ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan bifenilin insan lenfositlerinde KKD frekansını kontrol ve çözücü kontrole göre tüm dozlarda (10, 30, 50 ve 70 µg/ml) anlamlı miktarda artırdığını gözlemişlerdir [Rencüzoğulları ve ark., 2008]. Yavuz-Kocaman ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfitin insan lenfositlerinde 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda, kardeş kromatit değişimi frekansını kontrole göre önemli düzeyde artırdığını belirtmişlerdir [Yavuz-Kocaman ve ark., 2008].

Bu çalışmada kullanılan gıda katkı maddelerinin, mikronukleus oluşumu da tetiklediği belirlenmiştir. Bu maddelerin MN frekansı üzerine etkileri şu şekilde olmuştur. Sitrik asit, tüm konsantrasyonlarda, MN frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırmıştır. Fosforik asit, en düşük konsantrasyon olan 25 µg/ml hariç, tüm dozlarda MN frekansını istatistiksel olarak önemli oranda artırmıştır. Benzoik asit sadece en yüksek iki doz olan 200 ve 500 µg/ml'de mikronukleus frekansını kontrole göre anlamlı düzeyde artırmıştır. Kalsiyum

propiyonatin bu araştırmada kullanılan tüm konsantrasyonları, MN frekansını artırmıştır, bununla birlikte en yüksek doz olan 1000 µg/ml toksik etki göstermiştir. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı da tüm dozlarda, MN frekansını kontrole göre istatistiksel olarak önemli miktarda artırmıştır. Mikronükleuslar, asentrik fragment ve/veya mitozda kutuplara çekilememiş tam bir kromozomdan oluşurlar. Telofazda ayrı kalmış kromozomlar ve fragmentlerin etrafında çekirdek zarı teşekkül eder ve böylece ana nükleusdan daha küçük yapıda olan mikronükleuslar oluşur. Bu metod sadece bölünme özelliği gösterebilen hücrelerde kullanılabilir. Kromozom kayıplarının tam olarak belirlenebilmesi açısından MN metodu oldukça kullanışlıdır [Fenech, 2000].

Mikronükleus metodu, çeşitli gıda katkı maddelerinin genotoksik özelliklerinin belirlenmesinde başka araştırıcılar tarafından da kullanılmıştır. Rencüzoğulları ve ark. (2004), tatlandırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesi olan aspartamin sadece en yüksek dozda MN frekansını anlamlı seviyede artırdığını belirlemişlerdir [Rencüzoğulları ve ark., 2004]. Gıdalarda antimikrobiyal ajan olarak kullanılan 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene'in mikronükleus oluşumunu indüklediği belirlenmiştir [Boroto ve ark. 2004]. Macioszek ve Kononowicz (2004), gıdalarda renklendirici olarak kullanılan quinoline sarısı ve brillant siyahının insan lenfositlerinde kontrole göre tüm uygulamalarda MN frekansını artırdığını, bu iki maddeden Brillant siyahının quinoline sarısına göre daha fazla MN oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir [Macioszek ve Kononowicz, 2004]. Yapay tatlandırıcı olan maltitol, mikronükleus frekansını 24 saatlik uygulamada 1,25 ve 5 µg/ml'lik dozlarda, 48 saatlik uygulamada ise tüm dozlarda kontrole göre önemli oranda artırmıştır [Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006]. Kaya ve Topaktaş (2007), ağartıcı olarak kullanılan potasyum bromatin, 24 saatlik uygulamasında sadece 500 ve 550 µg/ml'de, 48 saatlik uygulamasında ise tüm dozlarda mikroçekirdek oluşumunu anlamlı olarak indüklediğini belirtmişlerdir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Antimikrobiyal bir madde olan bifenil, insan lenfositlerinde mikronükleus frekansını kontrol ve çözücü kontrole göre tüm dozlarda (10, 30, 50 ve 70 µg/ml) önemli oranda artırmıştır [Rencüzoğulları ve ark., 2008]. Yavuz-Kocaman ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfitin insan lenfositlerinde 25, 50,

100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda mikronükleus frekansını kontrole göre önemli oranda artırdığını gözlemişlerdir [Yavuz-Kocaman ve ark., 2008].

Komet testinde, sitrik asit sadece en yüksek konsantrasyonda DNA hasarını anlamlı düzeyde artırmıştır. 3000 µg/ml'lik doz toksik etki göstermiştir. Fosforik asit, DNA hasarını tüm dozlarda kontrole göre anlamlı oranda artırmıştır. En yüksek doz olan 200 µg/ml'deki DNA hasarının miktarı, kontrolün yaklaşık 9 katıdır. Benzoik asit, uygulanan tüm dozlarda DNA hasarını istatistiksel olarak önemli düzeyde artırmıştır. Kalsiyum propiyonat, kuyruk yoğunluğunu en düşük doz hariç, kuyruk uzunluğunu ise tüm dozlarda kontrole göre önemli miktarda artırmıştır. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı, kuyruk yoğunluğunu tüm konsantrasyonlarda, kuyruk uzunluğunu ise en yüksek iki konsantrasyonda anlamlı düzeyde artırmıştır. Komet testi son yıllarda geliştirilen, oldukça güvenilir bir test yöntemidir. *In vitro* ve *in vivo* daki birçok hücrede, çeşitli maddelerin etkisi ile meydana gelen DNA hasarının belirlenmesinde çokça kullanılmaktadır.

Gıda katkı maddelerinin *in vitro* DNA hasarları üzerine etkilerinin komet ile incelenmesi konusunda, şu ana kadar yapılmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Macioszek ve Kononowicz (2004), renklendirici olarak kullanılan quinoline sarısı ve brillant siyahının izole insan lenfositlerindeki DNA hasarını, kontrole göre tüm uygulamalarda artırdığını belirlemişlerdir. Blaszczyk (2006), antioksidan bir katkı maddesi olan ethoxyquin'in 1-250 µM'lık konsantrasyonlar arasında DNA hasarını kontrole göre ve doza bağlı olarak önemli oranda artırdığını gözlemişlerdir [Blaszczyk, 2006].

Sitotoksisitenin göstergesi olan mitotik indekste düşüş, bu çalışmada kullanılan maddelerde farklı derecelerde ortaya çıkmıştır. Sitrik asit, 24 saatlik uygulamada en yüksek dozda, 48 saatlik uygulamada ise tüm dozlarda mitotik indekste düşüslere neden olmuştur. Fosforik asit, 24 saatlik uygulamada en yüksek 2 dozda, 48 saatte ise 50 ve 200 µg/ml'de mitotik indeksi anlamlı düzeyde düşürmüştür. Benzoik asit uygulaması, 24 saatte en yüksek dozda, 48 saatte en düşük doz hariç tüm dozlarda mitotik indekste anlamlı düşüslere neden olmuştur. Kalsiyum propiyonat, 24 saatte

en yüksek dozda, 48 saatte tüm dozlarda mitotik indekste anlamlı azalmalara neden olmuştur. Sitrik asit ve fosforik asit karışımı, tüm uygulama süreleri ve konsantrasyonlarında, mitotik indeksi istatistiksel olarak anlamlı oranda düşürmüştür. Mitotik indekste bu düşüşler, çalışmada kullanılan bu maddelerin özellikle uygulama süresinin artmasına bağlı olarak sitotoksik etki gösterdiklerinin kanıtıdır. Bu maddelerin mitotik indeks üzerine etkileri, mitoza giren hücrede G₂ aşamasının bloke edilmesinden [Van't Hof, 1968] veya ATP seviyesinin düşüşüne bağlı olarak enerji üretim merkezlerinin baskılanmasından [Epel, 1963; Jain ve Andsorbhoy, 1988] yada DNA polimeraz gibi mitotik iğ ipliklerinde etkili olan çeşitli enzim yapılarının bozulmasından kaynaklanmış olabilir [Hidalgo ve ark., 1989; Yüzbaşıoğlu ve ark., 2006].

Çeşitli gıda katkı maddeleri ile yapılan çalışmalarda, bu maddelerin mitotik indeks üzerine etkileri de incelenmiştir. Antimikrobiyal bir madde olan sodyum metabisülfite, mitotik indeksi en yüksek iki konsantrasyon olan 150 ve 300 µg/ml'de kontrole göre önemli oranda düşürmüştür [Rencüzoğulları ve ark., 2001a]. Aspartam, mitotik indeksi tüm konsantrasyon ve sürelerde, kontrole göre önemli düzeyde azaltmıştır [Rencüzoğulları ve ark., 2004]. Arslan (2004), borik asitin 600 ve 800 µg/ml'lik konsantrasyonlarda, 24 saatlik uygulamada mitotik indeksi kontrole ve çözücü kontrole göre önemli oranda düşürdüğünü, 48 saatlik uygulamada ise tüm konsantrasyonlarda önemli oranda düşürdüğünü belirlemiştir [Arslan, 2004]. Canımoğlu ve Rencüzoğulları (2006), maltitolün mitotik indekste herhangi bir değişikliğe sebep olmadığını ve bu nedenle sitotoksik olmayan bir madde olduğunu belirtmişlerdir [Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006]. Gıdalarda un ağartıcısı olarak kullanılan potasyum bromat, mitotik indeksi tüm dozlarda önemli oranda düşürmüştür [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Mpountoukas ve ark. (2008) kültüre alınmış insan lenfositlerinde potasyum sorbatın ve sodyum benzoatın kullanılan dozlarda mitotik indeksi etkilemediğini, potasyum nitratın ise 0,2 mM'lık konsantrasyonda istatistiksel olarak önemli düzeyde düşürdüğünü belirlemişlerdir [Mpountoukas ve ark., 2008]. Rencüzoğulları ve ark. (2008), bifenilin 10, 30, 50 ve 70 µg/ml'lik konsantrasyonlarda, mitotik indeksi etkilemediğini gözlemişlerdir [Rencüzoğulları ve ark., 2008]. Antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfite, insan

lenfositlerinde 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda, mitotik indeksi kontrole göre önemli oranda düşürmüştür [Yavuz-Kocaman ve ark., 2008].

Bu çalışmada kullanılan gıda katkı maddeleri, replikasyon ve nükleer bölünme indekslerini etkilememiştir. Bu özellik çalışmada kullanılan maddelerin, daha ziyade hücre döngüsünün sentez safhasından sonra etki gösterdiklerini düşündürmektedir. Schilderman ve ark. (1995), antioksidan bir katkı maddesi olan bütillendirilmiş hidroksi anisol (BHA) ve bu maddenin metabolitleri olan tert-butylhydroquinone (TBHQ) ve tert-butylquinone'nin insan lenfositlerinde hücre proliferasyonunu 10, 50 ve 100 µM'lık konsantrasyonlarda önemli oranda artırdığını belirlemişlerdir [Schilderman ve ark., 1995]. Sodyum metabisülfite replikasyon indeksini en yüksek iki konsantrasyon olan 150 ve 300 µg/ml'de kontrole göre önemli oranda düşürmüştür [Rencüzoğulları ve ark., 2001a]. Borik asit, insan lenfositlerinde replikasyon indeksini tüm konsantrasyonlarda kontrole ve çözücü kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda düşürmüştür [Arslan, 2004]. Aspartam, replikasyon indeksini sadece 48 saatlik uygulamanın en yüksek konsantrasyonunda istatistiksel olarak önemli oranda düşürmüştür [Rencüzoğulları ve ark. 2004]. Borroto ve ark. (2004), antimikrobiyal etkili olan 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene'in uygulanan tüm sürelerde S9'lu ve S9'suz ortamda, hemen hemen tüm dozlarda nükleer bölünme indeksini kontrole göre önemli oranda düşürdüğünü, ancak replikasyon indeksini en fazla 48 saatlik ve S9'suz ortamda önemli oranda düşürdüğünü belirtmişlerdir [Borroto ve ark., 2004]. Yapay tatlandırıcı olan maltitol replikasyon indeksinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamıştır [Canımoğlu ve Rencüzoğulları, 2006]. Kaya ve Topaktaş (2007), potasyum bromatın replikasyon indeksini önemli oranda düşürdüğünü belirtmişlerdir [Kaya ve Topaktaş, 2007]. Mpountoukas ve ark. (2008) potasyum sorbat ve sodyum benzoatın, 4 ve 8 mM'lık konsantrasyonlarda replikasyon indeksini kontrole göre önemli oranda düşürdüğünü ancak potasyum nitritin bu indeksi etkilemediğini belirlemişlerdir [Mpountoukas ve ark., 2008]. Antimikrobiyal etkili katkı maddesi olan bifenil, replikasyon ve nükleer bölünme indekslerini en yüksek 2 doz olan 50 ve 70 µg/ml'lik konsantrasyonlarda kontrole göre önemli oranda düşürmüştür [Rencüzoğulları ve ark., 2008]. Yavuz-Kocaman ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfite

insan lenfositlerinde 25, 50, 100 ve 200 µg/ml'lik konsantrasyonlarda replikasyon ve nükleer bölünme indekslerini kontrole göre önemli oranda düşürerek sitotoksik etki gösterdiğini gözlemişlerdir [Yavuz-Kocaman ve ark., 2008].

Gıda katkı maddelerinin genotoksik etkilerinin belirlenmesinde *in vitro* insan periferik lenfositleri dışında, birçok *in vivo* ve *in vitro* yöntem de kullanılmaktadır. Roychoudhury ve Giri (1989) Fast green FCF, indigo karmin, oranj G, tartrazin ve metanil sarısının genotoksik etkilerini *A. cepa* kromozomlarında incelemişlerdir. Araştırmacılar, çalışmada kullanılan gıda boyalarının tamamının poliploid hücre oluşumuna neden olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu maddelerin yüksek dozlarının kromozom kırıklarına ve mikronükleus oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Kullanılan bu maddelerin arasında en fazla etkinin metanil sarısı ve Fast green FCF tarafından oluşturulduğu gözlenmiştir [Roychoudhury ve Giri, 1989].

Sodyum metabisülfidit sitogenetik etkileri *A. cepa*'da incelenmiştir. Araştırmacılar sodyum metabisülfidit 7,50, 15 ve 30 µg/ml'lik konsantrasyonlarını 10 ve 20 saat süre ile *A. cepa* kök uçlarına uygulamışlardır. Sodyum metabisülfidit mitotik indeksi tüm dozlarda ve uygulama sürelerinde, kontrole göre önemli oranda düşürmüştür. Sodyum metabisülfidit, aynı zamanda anormallik frekanslarını da önemli düzeyde artırmıştır [Rencüzoğulları ve ark., 2001b].

Dönbak ve ark. (2002), borik asidin sitogenetik etkilerini *Allium cepa* kromozomlarında incelemişlerdir. Borik asidin 1000, 2000 ve 4000 µg/ml'lik dozlarını 10 ve 20 saatlik sürelerle *A. cepa* kök uçlarına uygulamışlardır. Borik asit tüm uygulama grup ve sürelerinde mitotik indeksi kontrole göre önemli oranda düşürmüştür. Borik asit *Allium* kromozomlarında çoğunlukla c-mitoz oluşumuna neden olmuştur. Bu madde, anormallik frekansını, 10 saatlik uygulamanın tümünde, 20 saatlik uygulamada ise en yüksek konsantrasyonda istatistiksel olarak önemli oranda artırmıştır [Dönbak ve ark., 2002].

Macioszek ve Kononowicz (2004) quinoline sarısı ve brilliant siyahının *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde uygulanan tüm konsantrasyonlarda mikronükleus frekansını

kontrole göre istatistiksel olarak önemli oranda artırdığını ve mitotik indeksi önemli düzeyde düşürdüğünü gözlemişlerdir. Araştırmacılar bu iki maddenin, primer DNA hasarını önemli oranda artırdığını komet tekniği kullanarak belirlemişlerdir [Macioszek ve Kononowicz, 2004].

Bütillendirilmiş hidroksi anisolün *A. cepa*'da büyüme ve mitotik indeks üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada da, bu maddenin 194 μM 'lık konsantrasyonda *A. cepa*'nın gelişimini 50% oranda azalttığı, ayrıca 48 saatlik uygulamada, 283 μM 'lık konsantrasyonun mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğü belirlenmiştir [Jos ve ark., 2005].

Türkoğlu (2007), sodyum benzoat, borik asit, potasyum sorbat, sitrik asit ve sodyum sitratın genotoksik etkilerini *A. cepa* kök ucu hücrelerinde incelemişlerdir. Araştırmacı, çalışılan maddelerin tamamının mitotik bölünmeyi azalttığını gözlemiştir. Mitotik indeksteki düşüş, genel olarak uygulanan maddenin konsantrasyonuna ve uygulama süresine bağlı olarak düşüş göstermiştir. Anormallik frekansları, uygulanan maddenin dozu ve süresi arttıkça artış göstermiştir. Çalışmada uygulanan maddeler anafaz köprülerine, C-mitoza, mikroçekirdek oluşumuna, geri kalmış kromozomlara, yapışıklığa, çeşitli kırıklara ve eşit olmayan dağılımlara neden olmuştur [Türkoğlu, 2007].

Türkoğlu (2008), bir başka çalışmasında, sodyum propiyonat, kalsiyum propiyonat ve potasyum propiyonatın genotoksik etkilerini *A. cepa* kromozomlarında incelemiştir. Araştırmacı bu maddelerin 1000, 1500, 2000, 2500 ve 3000 $\mu\text{g/mL}$ 'lik konsantrasyonlarını, 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulamıştır. Araştırmacı bu maddelerin üçünün de mitotik indeksi önemli oranda düşürdüğünü, kromozomal anormallik frekansını da önemli oranda artırdığını belirlemiştir. Bu maddelerin etkisiyle c-mitoz, anafaz köprüleri, mikronükleus, yapışıklık, kalgın kromozomlar ve kromozom kırıklarına rastlanmıştır [Türkoğlu, 2008].

Olgunlaştırılmış peynirlerde koruyucu madde olarak kullanılan lizozimin *S. typhimurium*'un TA98 ve 100 suşlarında yapılan çalışmalar sonucunda, mutajenik

bir madde olduğu belirlenmiştir [Nagao ve ark., 1977]. Ebringer ve ark. (1982), nitrofuran grubuna ait olan 3-(5-nitro-2-furyl)akrilik asit (5-NFAA)'ın *Salmonella typhimurium*'un TA98 ve TA100 ile, *Escherichia coli*'nin WP2 uvrA+ ve WP2 uvrA suşlarında mutajenik etkili bir madde olduğunu yayınlamışlardır [Ebringer ve ark., 1982]. Pagano ve Zeiger (1987), sodyum bisülfidin *Salmonella typhimurium*'un hisG46 ve his D6610 mutasyonlarını içeren suşlarında pH=5 ve 6'da, zayıf bir mutajen olduğunu, hisC3076 ve hisD3052 mutasyonlarını içeren suşlarında mutajen olmadığını belirlemiştir [Pagano ve Zeiger, 1987].

Propionik asit ile yapılan bir çalışmada, bu maddenin *E. coli*'de DNA tamir testleri hariç, SOS chromo testi, *Salmonella*/mikrozom testi, *in vitro* kardeş kromatid değişimi testi ve *in vivo* mikronükleus testinde negatif etki gösterdiği belirlenmiştir [Basler ve ark. 1987]. Ohara ve ark. (1988), propionik asitin 160 µg/petri konsantrasyonunda, AMES'de mutasyon frekansını artırdığını belirtmişlerdir [Ohara ve ark. 1988]. Surjan (1989), bu maddenin *Drosophila*'da mitotik rekombinasyonlara neden olduğunu belirlemiştir [Surjan, 1989].

Rencüzoğulları ve ark. (2004), tatlandırıcı olarak kullanılan bir gıda katkı maddesi olan aspartamın genotoksik etkisini, AMES test yöntemi kullanarak belirlemiştir. Aspartamın herhangi bir mutajenik etkisine rastlanamamıştır [Rencüzoğulları ve ark., 2004]. Gıdalarda koruyucu madde olarak kullanılan sodyum benzoatın, çin hamsteri hücrelerinde özellikle yüksek konsantrasyonlarda, kromozomal anormallliği ve kardeş kromatit değişimini [Abe ve Sasaki, 1977] ve mitotik indeksi [Ishidate ve Odashima, 1977] artırdığı, *Vicia faba* kök ucu hücrelerinde doza bağlı olarak mitotik indekste azalmaya, kromatin erezyonu ve anafazda köprülere neden olduğu [Njagi ve Gopalan, 1982] belirlenmiştir.

Hasegawa ve ark. (1984), sorbik asit, sodyum sorbat ve potasyum sorbatı, Çin Hamsteri V79 hücrelerinde *in vitro* olarak KKD, KA ve GT6 dirençli mutasyonlarda çalışmışlardır. Araştırmacılar, sodyum sorbatın KKD, KA ve GT6 dirençli mutasyonlarda artışa neden olduğunu belirlemiştir. Sorbik asit ve potasyum sorbatın en yüksek dozlarda (1000 ve 2000 µg/ml) anormalliklere neden

olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar sodyum sorbatın potasyum sorbat ve sorbik asite oranla daha fazla klastojenik etkili bir madde olduğunu belirlemişlerdir [Hasegawa ve ark., 1984].

Ishidate ve ark. (1984), 190 sentetik, 52 doğal kaynaklı olmak üzere toplam 242 tane gıda katkı maddesinin genotoksik etkilerini, AMES ve *in vitro* Çin Hamsteri fibroblast hücrelerinde kromozom anormalliği testini kullanarak belirlemeye çalışmışlardır. Çalışılan katkı maddelerinden 3 tanesi (erythorbic asit, klorin dioksit ve beet red) sadece AMES testinde, 43 tanesi sadece çin hamsteri fibroblast hücrelerinde ve 11 tanesi ise (kalsiyum hipoklorit, cinnamik aldehit, L-sistein mono hidroklorit, ECF, hidrojen peroksit, potasyum bromat, sodyum klorit, sodyum hipoklorit, sodyum nitrit, kakao pigmenti ve karamel) her iki test yönteminde de pozitif etkili olarak bulunmuştur [Ishidate ve ark., 1984].

Luca ve ark. (1987), sodyum nitritin mutajenik etkilerini *in vivo* ve *in vitro* test yöntemleriyle araştırmışlardır. *In vivo* deneylerde, sodyum nitritin 1.72, 5.18, 15.55 ve 46.66 mg/kg'lık dozları rat, fare ve tavşana uygulanmıştır. Uygulama yapılan canlıların tamamında sodyum nitrit, kromozom anormalliği frekansını önemli oranda artırmıştır. Ayrıca farede mikronükleus oluşumunu da önemli oranda indüklemiştir. *In vitro* testler, BSC-1 ve HeLa hücrelerinde sodyum nitritin 265 ve 530 µg/ml'lik dozları kullanılarak yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda da bu madde kromozom anormalliği frekansını önemli oranda artırmıştır [Luca ve ark., 1987].

Gıdalarda koruyucu olarak görev yapan sodyum nitrit, *in vitro* hamster embriyonik hücrelerinde 50 ve 100 mM'lık konsantrasyonlarda ve çin hamsteri hücrelerinde kromozomal anormalliklere sebep olmuş, fare kemik iliği hücrelerinde KKD ve MN frekanslarını artırmıştır [Tsuda ve ark., 1976; Ishidate ve Odashima, 1977]. Ayrıca *S. typhimurium*'un TA1535 suşlarına mutajen olduğu belirlenmiştir [Akın ve Sümer, 1991].

Schlatter ve ark. (1992) sodyum sorbatın çin hamsteri V79 hücrelerinde 2500 µg/ml'lik konsantrasyonda mitoz bölünmeyi durdurduğunu belirlemişlerdir

[Schlatter ve ark., 1992]. Potasyum sorbat ve sodyum sorbatın genotoksik etkileri, AMES, Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde HGPRT ve KKD, fare ve Çin hamsteri kemik iliği hücrelerinde MN ve Çin hamsterinde KA ve KKD test yöntemleri kullanarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan maddeler, *in vitro* yöntemlerde herhangi bir etki göstermemiştir. Potasyum sorbatın taze hazırlanmış ve bekletilmiş çözeltileri *in vivo* çalışmalarda herhangi bir etki göstermezken, sodyum sorbatın bekletilmiş solüsyonu zayıf klastojenik etki göstermiştir. Bununla birlikte taze hazırlanmış sodyum sorbat çözeltisi herhangi bir etki göstermemiştir [Münzner ve ark., 1990]. Schlatter ve ark. (1992), Çin hamsteri V79 hücrelerinde 2500 µg/ml'lik konsantrasyonda, potasyum sorbatın mitotik indeksi düşürdüğünü ancak genotoksik etkili bir madde olmadığını belirlemişlerdir [Schlatter ve ark., 1992].

Mukherjee ve ark. (1992), ester gum'ın genotoksik ve klastojenik etkilerini *in vitro* olarak farede kromozom anormalliği ve kardeş kromatid değişimi test yöntemlerini kullanarak çalışmışlardır. Araştırmacılar, elde ettikleri bulgulara göre, ester gum'ın zayıf klastojenik etkili bir madde olduğunu belirlemişlerdir [Mukherjee ve ark., 1992].

Mukherjee ve Chakrabarti (1997), tatlandırıcı olarak kullanılan acesulfame-K'nın fare kemik iliği hücrelerinde 15, 30, 60, 450, 1500 and 2250 mg/kg dozlarda, doza bağlı olarak klastojenik etkide önemli bir artışa neden olduğunu belirlemişlerdir [Mukherjee ve Chakrabarti, 1997]. Birçok gıdada renklendirici olarak kullanılan titanyum dioksidin Çin hamsteri ovaryum hücrelerinde KKD ve MN frekanslarını önemli oranda artırdığı belirlenmiştir [Lu ve ark., 1998].

Gıdalarda koruyucu bir madde olarak kullanılan kalsiyum sorbatın HeLa hücreleri ve plazmid DNA ve AMES ile yapılan genotoksisite çalışmaları bu maddenin mutajenik olmadığını göstermiştir [Ferrand ve ark., 2000]. Sasaki ve ark. (2002) 39 gıda katkı maddesinin genotoksik etkilerini, 8 farklı fare organında komet tekniği ile incelemişlerdir. Araştırmacılar, farelere katkı maddelerini intraperitoneal olarak 3 ile 24 saat boyunca uygulamışlardır. Uygulama süreleri sonucunda farelerin mide, kolon, karaciğer, böbrek, idrar kesesi, akciğer, beyin ve kemik iliği dokularında olası DNA

hasarını tespit etmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, çalışmada kullanılan katkı maddelerinden bazılarının oldukça yüksek genotoksik riske sahip olduğunu göstermiştir. Allura kırmızısı, new coccine, tartrazin, erythrozin, filoksin ve rose bengal mide, kolon, ve idrar kesesi hücrelerinde DNA hasarını doza bağlı olarak artırmıştır. Bu boyaların tamamı gastrointestinal organlarda en düşük dozda bile DNA hasarına neden olmuştur. Bu boyalar içersinde allura kırmızısı, new coccine ve tartrazin ADI değerine yakın dozlarda, kolon hücrelerinde DNA hasarını artırmışlardır. Gıda boyaları dışında BHA, BHT, bifenil, sodyum o-fenilfenol, thiabendazol, sodyum siklomat, sakkarin, sodyum sakkarin ve sükraloz da gastrointestinal organlarda DNA hasarını artırmışlardır [Sasaki ve ark., 2002].

Sarıkaya ve Çakır (2005), sodyum nitrit, sodyum nitrat, potasyum nitrit ve potasyum nitratın genotoksik etkilerini *Drosophila*'da somatik mutasyon ve rekombinasyon testi ile araştırmıştır. Araştırmacılar, çalışmada kullanılan bu dört katkı maddesinin 50, 75 ve 100 mM'lık konsantrasyonlarının genotoksik etkili olduğunu belirtmiştir. Çalışmada en sık rastlanılan mutasyon tipinin small single spots tipi mutasyonlar olduğu ve konsantrasyon artışına bağlı olarak mutasyon frekansının arttığı belirtilmiştir [Sarıkaya ve Çakır, 2005].

Farombi ve Onyema (2006), gıdalarda sıklıkla kullanılan bir madde olan monosodyum glutamatın, ratlarda genotoksik etkilerini ve c vitamini, e vitamini ve quercetin'in koruyucu rolünü *in vivo* olarak çalışmışlardır. Monosodyum glutamat 4 mg/g dozda karaciğer, böbrek ve beyinde oksidatif hasara neden olmuştur ancak C ve E vitaminleri ve quercetin, bu hasarın oluşumunu inhibe etmişlerdir. Yine bu madde kemik iliğinde mikronükleus frekansını önemli oranda artırmış, ancak C vitamini ve quercetin bu oluşumu inhibe etmiştir. E vitamini, monosodyum glutamat etkisiyle oluşan genotoksik etkiyi inhibe edememiştir [Farombi ve Onyema, 2006].

Kayraldız ve Topaktaş (2007), sodyum metabisülfitin *in vivo* genotoksik etkilerini rat kemik iliği hücrelerinde kromozom anormalliği test yöntemiyle belirlemeye çalışmıştır. Araştırmacılar, sodyum metabisülfitin 250, 500, 750 ve 1000 mg/kg'lık dozlarını 6, 12 ve 24 saat süreyle ratlara intraperitoneal ve gavaj yoluyla

uygulamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda intraperitoneal uygulamanın daha etkili bir şekilde anormal hücre frekansını tüm dozlarda artırdığı belirlenmiştir. Aynı zamanda mitotik indeks, intraperitoneal uygulamada gavaja göre daha fazla düşüş göstermiştir. Sodyum metabisülfid kromatid ve kromozom kırıklarına, fragment oluşumuna, kromatid değişimlerine ve kardeş kromatidlerde birleşmeye neden olmuştur [Kayraldız ve Topaktaş, 2007].

Luan ve ark. (2007), un ağartıcısı olan potasyum bromatın *in vitro* genotoksik etkilerini, insan limfoblastoid TK6 hücrelerinde comet, mikronükleus ve timidin kinaz (TK) gen mutasyon testlerini kullanarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar, 4 saatlik uygulama sonucunda, alkali ve nötral comet testlerinde bu maddenin DNA'da tek ve çift zincir kırıklarına neden olduğunu, ayrıca mikronükleus oluşumunu ve TK mutasyonlarını doza bağlı olarak artırdığını belirtmişlerdir [Luan ve ark., 2007].

Yavuz-Kocaman ve ark. (2008), antimikrobiyal bir madde olan potasyum metabisülfidin rat kemik iliği hücrelerinde 150, 300 ve 600 mg/kg'lık dozlarda kromozom anormalliği frekansını kontrole göre önemli oranda artırdığını, mitotik indeksi ise düşürdüğünü belirtmişlerdir [Yavuz-Kocaman ve ark., 2008].

Bu çalışmada, genotoksik etkileri incelenen sitrik asit, organizmada birçok metabolik işlemde görev alan bir maddedir. Glikolizisde görev alan temel enzim olan fosfofruktokinazın inhibitörüdür. Yine yüksek yapıli organizmalarda, gıdalarda bulunan kalsiyumun etkin şekilde kullanımında da görev almaktadır. Sitrik asit, kan plazmasında submilimolar düzeyde bulunur ve hemoglobine bağıli olmayan demirin biyolojik olarak aktivasyonunu kontrol eder. Nonheme demir ile birleşerek, demir sitrat komplekslerini oluşturur. Demir sitrat kompleksi, canlı organizmalarda demir metabolizmasında oldukça önemli bir rol oynamaktadır [Gautier-luneau ve ark., 2007]. Kan plazmasında serbest olarak bulunan demirin aktiveştirilmesi, her ne kadar organizma için gerekli ise de bu işlem oldukça toksik olan serbest hidrojen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır [Pierre ve Fontecave, 1999]. Gautier-luneau ve ark. (2007), demir sitrat kompleksi ile birlikte, H₂O₂ bulunan ortamda oldukça fazla oranda OH⁻ radikalleri oluştuğunu belirlemişlerdir [Gautier-luneau ve

ark., 2007]. Yine demir-sitrat kompleksi, mitokondriyal lipid peroksidasyonuna neden olabilmekte [Castilho ve ark., 1999; Santos ve ark., 2001], ferrik sitratın oto indirgenmesi sırasında OH^- radikalleri oluşabilmektedir [Gutteridge, 1991]. Serbest radikaller, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir [Mercan, 2004]. Serbest radikallerin yüksek düzeyde reaktif bileşikler olmaları, en dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektron taşımalarından ve bu nedenle kolayca diğer organik ve anorganik moleküllerle reaksiyona girmelerinden kaynaklanmaktadır [Saraç, 2005]. Serbest radikaller kararsız bir yapıda oldukları için, hücrede DNA gibi birçok organik molekülle reaksiyona girip, çeşitli anormalliklere neden olabilirler.

Demirin aktifleştirilmesinde ve aynı zamanda çözünür hale gelmesinde önemli rolü olan sitrik asidin, bu kompleks etkileşimler sırasında serbest radikal oluşumuna sebep olması, bu maddenin gerçekten, uluslararası otoritelerin belirttiği gibi güvenli bir katkı maddesi olup olmadığı konusunu düşündürücü boyutlara ulaştırmaktadır [Gautier-luneau ve ark., 2007]. Çalışmamız sırasında, sitrik asitin göstermiş olduğu genotoksik etki, büyük bir olasılıkla demir sitrat kompleksleri nedeniyle oluşan serbest hidroksil radikalleri nedeniyledir.

Bu çalışmada kullanılan diğer bir madde olan fosforik asit, birçok hazır gıdada, antioksidan katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikal yakalayıcı bir özellik göstermektedirler. Antioksidanlar, serbest radikaller için kolay bir elektron hedefi oluştururlar. Eğer serbest radikaller, istedikleri elektronu antioksidanlardan sağarlarsa başka bir yapıya zarar vermezler [Taner, 2007]. Böylece antioksidanlar, serbest radikallerin etkilerini nötralleştirerek diğer maddelerle reaksiyona girmelerini engellerler. Bununla birlikte birçok antioksidan madde, belirli konsantrasyonların üzerinde prooksidan etki göstererek DNA'da hasar meydana getirebilmektedir. Pro-oksidan aktivite, bir antioksidanın ortamda bulunmadığı zamandan, daha fazla oksidatif stres oluşturduğu durumdaki aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Bir bileşiğin oksidan moleküle elektron verme yeteneği bu bileşiği antioksidan yapar. Ancak farklı koşullar altında bu özellik, bileşiği bir pro-oksidana da dönüştürebilir [Atmaca, 2004]. Çalışmamızda antioksidan olarak

kullanılan maddelerden fosforik asit, prooksidan etki göstererek kromozomal anormalliklere ve DNA hasarına neden olmuş olabilir.

Bu araştırmada kullanılan maddelerden benzoik asit ve kalsiyum propiyonat da, diğer maddeler gibi, insan lenfositlerinde genotoksik etki göstermiştir. Diğer birçok antimikrobiyal maddelerde olduğu gibi, bu iki antimikrobiyal madde de genotoksik etkilidir. Bu maddelerin genotoksik etki mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, insan lenfositlerinde meydana gelen bioaktivasyon sonucunda, farklı ve daha aktif metabolitlere dönüşmeleri ile gerçekleşmiş olabilir. Yapılan çalışmalarda XRCC1, PARP-1 ve DNA LIG3 gibi proteinlerin fonksiyonlarında meydana gelen bozuklukların, DNA'da tek zincir kırıklarına sebep olduğu belirtilmiştir [Wang ve ark., 2005]. Bu çalışmada kullanılan benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın da bu proteinlerin fonksiyonlarında bozulmalara neden olarak, DNA'da tek zincir kırıklarına sebep olduğu ve böylece mutajenik etkilerini ortaya çıkardığı düşünülebilir. Bununla birlikte, büyük sitosolik fosfoprotein olan ve mikrotübüllerin düzenlenmesinde görev alan OP18/statmin aktivitesinin, bu maddeler ya da bunların metabolitlerinin etkisiyle engellenmesi ile sitotoksik etkilerini ortaya çıkarmış olabilirler. Ancak bunların etki mekanizması ile ilgili detaylı çalışmaların yapılması gereklidir.

Sitrik asit ve fosforik asitin birlikte uygulaması da, insan lenfositlerinde çeşitli anormalliklere neden olmuştur. Ancak bu uygulama, her iki maddenin tek başlarına uygulamalarından daha fazla genotoksik aktivite göstermemiştir. Bir arada kullanıldıklarında, DNA'daki hasar miktarını, tek başlarına kullanılmalarından daha fazla arttırmamasının nedeni, bu maddelerin birbirleri üzerinde antagonistik bir etki göstermesi ve dolayısıyla etki azalmasından kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda kullanılan katkı maddeleri olan sitrik asit, fosforik asit, benzoik asit ve kalsiyum propiyonatın, insan lenfositlerinde genotoksik, sitotoksik ve aneugenik etkili olduğu gözlenmiştir. Ancak bu maddelerin etki mekanizmalarını belirleyebilmek ve genotoksik maddelerdir diyebilmek için, diğer genotoksik test sistemleriyle de test edilmeleri gerekmektedir. Ancak yine de, tüm dünyada

kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve üreticiler açısından büyük önem taşıyan gıda katkı maddelerinin, insan sağlığı açısından risk oluşturup oluşturmadığı, özellikle fast food alışkanlığının ve hazır besinlere olan düşkünlüğün arttığı şu günlerde oldukça önem arz etmektedir. Bu çalışmada ve daha önce yapılan birçok çalışmada, çeşitli gıda katkı maddelerinin toksik ya da genotoksik risklere sahip olduğu, hatta bazılarının karsinojenik özellikte olduğu kanıtlanmıştır. Bu şekilde zararlı etkileri bilinen maddelerin kullanımının sınırlandırılması ya da kullanımdan kaldırılması gerekmektedir. Bununla birlikte, henüz çok fazla toksisite testleri yapılmamış ve tamamlanmamış olan katkı maddelerinin, bir an önce bu eksikliklerinin ulusal ve uluslar arası sağlık otoriteleri tarafından giderilmesi ve insanlar için gerçekten güvenli olanların belirli dozlarda kullanımına izin verilmesi gerekmektedir. Tüketicilerin de katkılı gıdalardan ziyade, doğal olanlarına yönelmeleri, en azından hazır gıda tüketimini minimuma indirmeleri, sağlık açısından oldukça önemli görünmektedir.

KAYNAKLAR

Abe, S., Sasaki, M., "Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals", *J. Natl. Cancer Inst.*, 58: 1635-1643 (1977).

Akın, A., "Bazı gıda katkı maddelerinin Salmonella mikrozoim test sistemi ile mutajenik etkilerinin saptanması", Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 14-15 (1990).

Akın, A., Sümer, S., "The mutagenic effects of sodium nitrite and monosodium glutamate used as food additives demonstrated by the Salmonella microsome test system", *Microbiol Bul.*, 25: 94-107 (1991).

Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., "Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers", *J. App. Toxicol.*, 26 (1): 10-15 (2006).

Aktaş, T., Kaboglu, A., Ertan, F., Ekinci, F., Huseynova, G., "The effects of citric acid (antioxidant) and benzoic acid (antimicrobial agent) on the mouse liver: biochemical and histopathological study", *Biologia, Bratislava*, 58: 343-347 (2003).

Altuğ, T., Boyacıoğlu, D., Kurtcan, Ü., Demirağ, K., "Gıda Katkı Maddeleri Analiz Yöntemleri", Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Yayınları", *Ege Üniversitesi Basımevi*, Bornova, İzmir, 1-2 (2000).

Andersen, M.K., Pedersen-Bjagaard, J., "Increased frequency of dicentric chromosomes in therapy-related MDS and AML compared to *de novo* disease is significantly related to previous treatment with alkylating agents and suggests a specific susceptibility to chromosome breakage at the centromere", *Leukemia*, 14 (1): 105-111 (2000).

Arslan, M., "Borik Asit'in insan periferik lenfositlerinde *in vitro* kromozom aberasyonu ve kardeş kromatid değişimi üzerindeki etkileri", Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, 1-62 (2004).

Atmaca, G., "Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids", *Yonsei Medical Journal*, 45 (5): 776-788 (2004).

Basler, A., Von der Hude, W., Scheutwinkel, M., "Screening of the food additive propionic acid for genotoxic properties", *Food Chem. Toxicol.*, 25: 287-290 (1987).

Beier, R.C., "Natural Pesticides and bioactive components in foods", *Rev. Environ. Contam. Tox.*, 133: 47-123 (1990).

Blaszczyk, A., "DNA damage induced by ethoxyquin in human peripheral lymphocytes", *Toxicol. Let.*, 163: 77-83 (2006).

Bolognesi, C., "Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies", *Mutat. Res.*, 543: 251-272 (2003).

Bonassi, S., Abbondandolo, A., Camurri, L., Dal Pra, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Padovani, P., Sbrana, L., Vecchio, D., Puntoni, R., "Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans?", *Cancer Genet. Cytogenet.*, 79 (2): 133-135 (1995).

Borroto, J.I.G., Perez, G., Creus, A., Marcos, R., "Genotoxicity testing of the furylethylene derivative 1-(5-bromofur-2-yl)-2-bromo-2-nitroethene in cultured human lymphocytes", *Food Chem. Toxicol.*, 42: 187-193 (2004).

Canımoğlu, S., Rencüzoğulları, E., "The Cytogenetic effects of Food Sweetener Maltitol in Human Peripheral Lymphocytes", *Drug Chem. Toxicol.*, 29: 269-278 (2006)

Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Vercesi, A.E., Hermes-Lima, M., "Role of Fe(III) in Fe(II) citrate-mediated peroxidation of mitochondrial membrane lipids", *Mol. Cell Biochem.*, 196: 163-168 (1999).

Cortes, F., Pastor, N., "Induction of endoreduplication by topoisomerase II catalytic inhibitors", *Mutagenesis*, 18(2): 105-112 (2003).

Çakmak, G., "Trafik Polisi ve taksi sürücüleri hava kirliliği maruziyetine yönelik idrarda 1- Hidroksipiren değerlerinin, periferik lenfositlerde kromozomal aberasyon ve MÇ sıklığının araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 28-107 (2000).

Çelik, M., "Dinocap fungusinin *Allium cepa* L. Kök ucu hücreleri ve insan periferik lenfositlerinde sitogenetik etkileri", Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-102 (2003).

Demirel, S., Zamani, A.G., "Mikronükleus tekniği ve kullanım alanları", *Genel Tıp Dergisi*, 12 (3):123-127 (2002).

DOSE (The Dictionary of Substances and their Effects), *Royal Society of Chemistry*, Cambridge, 6: 1-1000 (1994).

Dönbak, L., Rencüzoğulları, E., Topaktaş, M., "The cytogenetic effects of the food additive Boric acid in *Allium cepa* L.", *Cytologia*, 67: 153-157 (2002).

Ebringer, L., Subík, J., Lahitová, N., Trubacík, S., Horváthová, R., Siekel, P., Krajcovic, J., "Mutagenic effects of two nitrofurans food preservatives", *Neoplasma*, 29 (6): 675-684 (1982).

Ekşi, A., "Gıda kalite kontrol uygulaması ve standardizasyonu", *Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları*, Ankara, 131 (1989).

Elmacı, Y., “Asitliği düzenleyiciler”, Gıda Katkı Maddeleri, Tomris Altuğ, **META basım**, İzmir, 46 (2001).

Epel, D., “The effects of carbonmonoxide inhibition of ATP level and the date of mitosis in sea urching egg”, **J. Cell. Biol.**, 17: 315-319 (1963).

Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O’neill, K.L., “The comet assay: a comprehensive rewiev”, **Mutat. Res.** 339: 37-59 (1995).

Farombi, E.O., Onyema, O.O., “Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin”, **Hum. Exp. Toxicol.**, 25 (5): 251-259 (2006).

Fenech, M., Morley, A.A., “Solutions to the kinetic problemsin the micronucleus assay”, **Cytobios**, 43: 233-46 (1985).

Fenech, M., “The *in vitro* micronucleus technique”, **Mutat. Res.**, 455 (1-2): 81-95 (2000).

Fenech, M., “Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death”, **Mutat. Res.**, 600: 58-66 (2006).

Ferrand, C., Marc, F., Fritsch, P., Cossand, P., DeSaint Blanguat, G., “Mutagenicity and genotoxicity of sorbic acid”, **Toxicol. In vitro.**, 14 (5): 423-428 (2000).

Fiskesjo, G., “The *Allium* test as a standard in environmental monitoring”, **Hereditas**, 102: 99–112 (1985).

Gautier-luneau, I., Bertet, P., Jeunet, A., Serratrice, G., Pierre, J.L., “Iron-citrate complexes and free radicals generation: Is citric acid an innocent additive in foods and drinks?”, **Bio Metals**, 20: 793-796 (2007).

Göçmen, D., “Ticari Bir Değirmendeki Ekmeklik Buğday Unu Pasajlarının Kimyasal Bileşim ve Kalite Kriterleri”, **Gıda**, 26 (3): 171-178 (2001).

Gözükara, E.M., “Biyokimya” **Ofset Repromat**, Ankara, 837-875 (1989).

Gutteridge, J.M.C., “Hydroxyl radical formation from the auto-reduction of a ferric citrate complex”, **Free Rad. Biol. Med.**, 11: 401-406 (1991).

Gürsoy, S., “Besinlerde Katkı Maddelerinin Kullanımı ve Sitrik Asit Toksisitesi”, Yüksek Lisans Tezi, **Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Tekirdağ, 1-48 (2001).

Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H., Reuterwall, C., “Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a

report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH)", *Cancer Res.*, 58 (18): 4117-4121 (1998).

Hasegawa, M.M., Nishi, Y., Ohkawa, Y., Inui, N., "Effects of sorbic acid and its salts on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and gene mutations in cultured chinese hamster cells", *Food Chem. Toxicol.*, 22 (7): 501-507 (1984).

Hidalgo, A., Gonzales-Reyes, J.A. Navas, P., Garcia-Herdugo, G., "Abnormal mitosis and growth inhibition in *Allium cepa* roots induced by protham and chlorprotham", *Cytobios* 57: 7-14 (1989).

Ikeuchi, T., Matsui, S., "The phenomenon of chromosome pulverization", *Symp. Cell Biol*, 26: 67-76 (1974).

International Agency for Research on Cancer (IARC), "2-[2-Furyl]-3-[5-nitro-2-furyl] acrylamide [AF-2], in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some food additives, Feed Additives and naturally Occurring Substances", *World Health Organization*, 31: 47 (1983).

International Agency for Research on Cancer (IARC), "*p*-Dimethylaminoazobenzene, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some aromatic azo compounds", *World Health Organization*, 8: 125-139 (1975).

Ishidate, M Jr., Odashima, S., "Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* a screening for chemical carcinogens", *Mutat. Res.*, 48: 337-353 (1977).

İnternet: Turktox "Gıda Katkı Maddeleri ve Gıda Kontaminantları" <http://www.turktox.org.tr/gida/> (2008).

İnternet: Inchem, Benzoic acid and Sodium benzoate", <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad26.htm> (2000).

İnternet: WHO, "Food Additives Series", <http://www.who.int/ipcs/publications/jecfa/monographs/en/index.html> (2001).

Ishidate, M Jr., Sofuni, T., Yoshikawa, K., Hayashi, M., Nohmi, T., Sawada, M. and Matsuoka, A., "Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan", *Food Chem. Toxicol.*, 22: 623-636 (1984).

Jain, A.K., Andsorbhoy, R.K. "Cytogenetical studies on the effects of some chlorinated pesticides III. Concluding Remarks", *Cytologia*, 53: 427-436 (1988).

Johnson, F.M., "How many high production chemicals are rodent carcinogens? Why should we care? What do we need to do about it?", *Mutat. Res.*, 543: 201-215 (2003).

Jos, A., Repeto, G., Rios, J.C., Del Peso, A., Salguero, M., Hazen, M.J., Molero M.L., Fernandez-Freire, P., Perez-Martin, J.M., Labrador, V., Camean, A., "Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints", *Aquat. Toxicol.*, 71 (2): 183-192 (2005)

Kaderlik, R.K., Lin, D.X., Long, N.P., "Advantages and Limitation of Laboratory Methods for Measurement of Carcinogen DNA Adducts for Epidemiological Studies", *Toxicol. Lett.*, 64: 469-475 (1992).

Karaali, A., "Avrupa topluluğu ve ABD'de gıda mevzuatı ve uygulamaları", *Gıda Sanayi*, 2 (7): 29-32 (1994).

Kaya, F.F., Topaktaş, M., "Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes *in vitro*", *Mutat. Res.*, 626: 48-52 (2007).

Kayraldız, A., Topaktaş, M., "Indirect genotoxic effect of gamma rays in human peripheral lymphocytes", *Cytologia*, 66: 25-31 (2001).

Kayraldız, A., Topaktaş, M., "The *in vivo* Genotoxic effects of sodium metabisulfite in bone marrow cells of rats", *Russ. J. Genet.*, 43(8): 905-909 (2007).

Koçak, Y., "Sitrik Asitin *Tinca tinca* (L., 1758) (Pisces: Cyprinidae) üzerindeki genotoksik etkisinin mikronükleus testi ile belirlenmesi", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-44 (2005).

Lu, P., Ho, I., Lee, T., "Induction of sister chromatid exchanges and micronuclei by titanium dioxide in Chinese hamster ovary-K1 cells", *Mutat. Res.*, 414: 15-20 (1998).

Luan, Y., Suzuki, T., Palanisamy, R., Takashima, Y., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Saito, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Yamaguchi, T., Hayashi, M., Honma, M., "Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC > TA transversion in human cells" *Mutat. Res.*, 619 (1-2): 113-123 (2007).

Luca, D., Luca, V., Cotor, Fl., Răileanu, L., "*In vivo* and *in vitro* cytogenetic damage induced by sodium nitrite", *Mutat. Res.*, 189: 333-339 (1987).

Macioszek, V.K., Kononowicz, A.K., "The evaluation of the genotoxicity of two commonly used food colors: Quinoline yellow (E 104) and Brilliant black BN (E 151)", *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 9: 107-122 (2004).

Mercan, U., "Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi", *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1-2): 91-96 (2004).

Migliore, L., Nieri, M., Amodio, S., Loprieno, N., "The Human Lymphocyte Micronucleus assay: A Comparison Between Whole-Blood and Separated-Lymphocyte Culture", *Mutat. Res.*, 227: 167-162 (1989).

Mpountoukas, P., Vantarakis, A., Sivridis, E., Lialiaris, T., "Cytogenetic study in cultured human lymphocytes treated with three commonly used preservatives", *Food Chem. Toxicol.*, 46(7): 2390-2393 (2008).

Mukherjee, A., Agarwal, K., Chakrabarti, J., "Genotoxicity studies of the food additive ester gum", *Food Chem. Toxicol.*, 30 (7): 627-630 (1992)

Mukherjee, A., Chakrabarti, J., "In vivo cytogenetic studies on mice exposed to acesulfame-K-a non-nutritive sweetener", *Food Chem. Toxicol.*, 35 (12): 1177-1179 (1997).

Münzner, R., Guigas, C., Renner, H.W., "Re-examination of potassium sorbate and sodium sorbate for possible genotoxic potential", *Food Chem. Toxicol.*, 28: 397-401 (1990).

Nagao, M., Honda, M., Seino, Y., Yahagi, T., Kawachi, T., "Mutagenicities of protein prolysates", *Cancer Lett.* 2 (6): 335-339 (1977).

Natarajan, A.T., "Chromosome aberrations: past, present and future", *Mutat. Res.* 504: 3-16 (2002).

Njagi, G.D., Gopalan, H.N., "Cytogenetic effects of the food preservatives sodium benzoate and sodium sulphite on vicia faba root meristems", *Mutat. Res.*, 102 (3): 213-219 (1982).

Ohara, A., Mizuno, M., Danno, G., Kanazawa, K., Yoshioka, T., Natake, M., "Mutagen formed from tryptophan reacted with sodium nitrite in acidic solution" *Mutat. Res.*, 206 (1): 65-71 (1988).

Ohta, T., Moriya, M., Kaneda, Y., Watanabe, K., Miyazawa, T., Sugiyama, F., Shirasu, Y., "Mutagenicity screening of feed additives in the microbial system", *Mutat. Res.*, 77: 21-30 (1980).

Ostling, O., Johanson, K.J., "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123: 291-298 (1984).

Pagano, D.A., Zeiger, E., "Conditions affecting the mutagenicity of sodium bisulfite", *Mutat. Res.*, 179: 159-166 (1987).

Palitti, F.C., Tanzarella, C., Cozzi, R., Ricondy, E., Vitagliana, A., Fiori, M., "Comparison of frequencies of SCEs induced by chemical mutagens in bone-marrow spleen and spermatogoneal cells of mice", *Mutat. Res.*, 103: 191-195 (1982).

Pierre, J.L., Fontecave, M., “Iron and activated oxygen species in biology: the basic chemistry”, *Biometals*, 13: 91-96 (1999).

Rank, J., Nielsen, M.H., “A modified Allium test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures”, *Hereditas*, 118: 49-53 (1993).

Rencüzoğulları, E., İla, H.B., Kayraldız, A., Topaktaş, M., “Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with sodium metabisulfite, a food preservative”, *Mutat. Res.*, 490: 107-112 (2001a).

Rencüzoğulları, E., Kayraldız, A., İla, H.B., Çakmak, T., Topaktaş, M., “The Cytogenetic Effects of Sodium Metabisulfite, a Food Preservative in Root Tip Cells of Allium cepa L.” *Tr. J. Biol.*, 25: 361-370 (2001b).

Rencüzoğulları, E., Tüylü, B.A., Topaktaş, M., İla, H.B., Kayraldız, A., Arslan, M., Diler, S., “Genotoxicity of Aspartame”, *Drug Chem. Toxicol.*, 27 (3): 257-268 (2004)

Rencüzoğulları, E., Parlak, S., İla, H.B., “The Effects of Food Protector Biphenyl on Sister Chromatid Exchange, Chromosome Aberrations, and Micronucleus in Human Lymphocytes”, *Drug Chem. Toxicol.*, 31 (2): 263-274 (2008)

Ross, G.M., Mcnillan, T.J., Wilcox, P., Collins, A.R., “The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay) technical aspects and application. Report of the Fifth LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer research”, *Mutat. Res.*, 337: 57-60 (1995).

Roychoudhury, A., Giri, K., “Effects of certain food dyes on chromosomes of Allium cepa”, *Mutat. Res.*, 223: 313-319 (1989).

Rydberg, B., Johanson, K. J., “DNA repair Mechanism”, *Academic Press*, Newyork, 465-468 (1978).

Salama, S.A., Serrana, M., Au, W.W., “Biomonitoring using accessible human cells for exposure and health risk assessment”, *Mutat. Res.*, 436: 99-112 (1999).

Saldamh, İ., “Gıda katkı maddeleri ve ingrediyenler”, *Hacettepe Üniv. Gıda Müh. Der.*, Ankara, 3-125 (1985).

Santos, N.C.J., Castilho, R.F., Meinicke, A.R., Hermes-Lima, M., “The iron chelator pyridoxal isonicotinoyl hydrazone inhibits mitochondrial lipid peroxidation induced by Fe(II)-citrate”, *Eur. J. Pharmacol.*, 428: 37-44 (2001).

Saraç, E., “Doğanın Şifalı Eli”, *Doğan Kitapçılık*, İstanbul, 25-26 (2005).

Sarıkaya, R., “Sodyum Nitrit, Sodyum Nitrat, Potasyum Nitrit ve Potasyum Nitrat’ın Genotoksik Etkisinin Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Araştırılması”, Doktora Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-110 (2005).

Sarıkaya, R., Çakır, Ş., “Genotoxicity of four food preservatives and their combinations in the *Drosophila* wing spot test”, **Environ. Tox. Pharma.**, 20: 424-430 (2005).

Sarıkaya, R., Solak, K., “Benzoik Asit’in *Drosophila melanogaster*’de Somatik Mutasyon ve Rekombinasyon Testi ile Genotoksitesinin Araştırılması”, **GÜ, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi** 23 (3): 19-32 (2003).

Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., “The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives”, **Mutat. Res.**, 519 (1-2): 103-119 (2002).

Satoh, T., Hatanaka, M., Yamamoto, K., Kuro-o, M., Sofuni, T., “Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes”, **Mutat. Res.**, 504: 57-65 (2002).

Savage, J.R.K., “Update on target theory as applied to chromosomal aberrations”, **Environ. Mol. Mutagen.**, 22: 198-207 (1993).

Saygı, Ş., “Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi”, **Gülhane Tıp Dergisi**, 45 (3): 291-298 (2003).

Schilderman, P.A., Rhijnsburger, E., Zwingmann, I., Kleinjans, J.C., “Induction of oxidative DNA damages and enhancement of cell proliferation in human lymphocytes *in vitro* by butylated hydroxyanisole”, **Carcinogenesis**, 16 (3): 507-512 (1995).

Schlatter, J., Wurgler, F.E., Kranzlin, R., Maier, P., Halliger, E., Graf, U., “The potential genotoxicity of sorbates: effects on cell cycle *in vitro* in V79 cells and somatic mutations in *Drosophila*”, **Food Chem. Toxicol.**, 30 (10): 843-851 (1992).

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., “A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells”, **Exp. Cell Res.**, 175: 184-191 (1988).

Surjan, A., “Analysis of genotoxic activity of 16 compounds and mixtures by the *Drosophila* mosaic test” **Ann. Ist. Super Sanita.**, 25 (4): 569-572 (1989).

Taner, G., “Lipoik asit ve ferulik asitin insan lenfosit kültüründe mitomisin-C’ye karşı antigenotoksik etkileri”, Yüksek Lisans Tezi, **Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Ankara, 1-93 (2007).

Taylor, J.H., "Sister chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes" *Genetics*, 43: 515–529 (1958).

Tice, R.R., Vazquez, M., "Protocol for the application of the pH>13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells", *ILS*, 1-9 (1998).

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., "Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing", *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 206-221 (2000).

Tohda, H., Horaguchi, K., Takahashi, K., Oikawa, A., Matsushima, T., "Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cells for study of sister chromatid exchange and their evaluation as a test system" *Cancer. Res.*, 40 (12): 4775-4780 (1980).

Topaktaş, M., Speit, G., "İnsan lenfositlerinde prometryn herbisiti ile SCE ve CA'nın indüklenmesi", *Tr. J. Biol.*, 14: 69-78 (1990).

Topaktaş, M., Rencüzoğulları, E., "Sitogenetik", *Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü*, Adana, 68-113 (1995).

Tsuda, H., Inui, N., Takayama, S., "In vitro transformation of newborn hamster cells induced by sodium nitrite" *Gann*, 67 (2): 165-173 (1976).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, *T.C. Resmi Gazete*, Sayı: 23172, 1-220, (1997).

Türkoğlu, Ş., "Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L.", *Mutat. Res.*, 626 (1-2): 4-14 (2007).

Türkoğlu, Ş., "Evaluation of genotoxic effects of sodium propionate, calcium propionate and potassium propionate on the root meristem cells of *Allium cepa*", *Food Chem. Toxicol.* 46 (6): 2035-2041 (2008).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, *T.C. Resmi Gazete*, Sayı: 26883, 1-220, (1997).

Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği, Türk Gıda Kodeksi Renklendiriciler ve Tatlandırıcılar Dışındaki Gıda Katkı Maddeleri Tebliği, *T.C. Resmi Gazete*, Sayı: 26883, (2008).

Ünal, Y., "Radyoterapi gören kanserli hastalara ait kan lenfositlerinde DNA hasarının comet assay tekniği ile araştırılması", Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 1-87 (1998).

Van't Hof, J., "The action of IAA and kinetin on the mitotic cycle of proliferative and stationary phase excised root meristem" *Exp. Cell. Res.*, 51: 167-176 (1968).

Wang, H., Rosidi, B., Perrault, R., Wang, M., Zhang, L., Windhofer, F., Iliakis, G., "DNA Ligase III as a Candidate Component of Backup Pathways of Nonhomologous End Joining", **Cancer. Res.**, 65 (10): 4020-4030 (2005).

Wilson, O.C., Gisvold, O., Block, J.H., "Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical", **Lippincott Williams & Wilkins**, 234 (2004).

Wilson III, D.M., Thompson, L.H., "Molecular mechanism of sister chromatid exchange", **Mutat. Res.**, 616 (1-2): 11-23 (2007).

Yavuz-Kocaman, A., Rencüzoğulları, E., İla, H.B., Topaktas, M., "The Genotoxic Effect of Potassium Metabisulfite Using Chromosome Aberration, Sister Chromatid Exchange, Micronucleus Tests in Human Lymphocytes and Chromosome Aberration Test in BoneMarrow Cells of Rats", **Environ. Mol. Mutagen.**, 49: 276-282 (2008).

Yılmaz, S., Aksoy, H., Ünal, F., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., "Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*", **Russian Journal of Genetics**, 44 (3): 273-278 (2008)

Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., "Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes", **Mutat. Res.** 604 (1-2): 53-59 (2006).

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Çelik, M., "Genotoxicity Testing of Flucanazole *In Vivo* and *In Vitro*", **Mutat. Res.**, 649 (1-2): 155-160 (2008).

Zeiger, E., Anderson, B., Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., "Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals", **Environ Mol. Mutagen.**, 12 (1): 1-158 (1988).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : YILMAZ, Serkan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 25.08.1978, Ankara
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 202 12 09
 Faks : 0 (312) 212 22 79
 e-mail : syilmaz@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	2002
Lisans	Gazi Üniversitesi/Biyoloji Bölümü	1999
Lise	Başkent Lisesi	1995

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000-2008	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A) SCI Tarafından Taranan Bilimsel Dergilerde Yapılan Yayınlar

1. Aksoy H., Yılmaz S., Çelik M., Yüzbaşıoğlu D., Ünal, F., “Genotoxicity study in lymphocytes of offset printing workers”, Journal of Applied Toxicology, 26 (1): 10-15 (2006).

2. Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., Yılmaz S., Ünal F., Aksoy H., “Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes”, Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis) 604 (1-2): 53-59 (2006).
3. Çelik M., Ünal F., Yüzbaşıoğlu D., Yılmaz S., Aksoy H., Karaman Ş., “Effects of *Thymus kotschyanus* var. *glabrescens* Boiss. extract on mitomycin-C induced chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes”, Cytotechnology, 51 (2): 99-104 (2006).
4. Çelik M., Dönbak L., Ünal F., Yüzbaşıoğlu D., Aksoy H., Yılmaz S., “Cytogenetic damage in workers from a Coal-Fired Power Plant”, Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis). 627 (2): 158-163 (2007).
5. Yılmaz S., Aksoy H., Ünal F., Çelik M., Yüzbaşıoğlu D., “Genotoxic action of fungicide Conan 5FL on mammalian cells *in vivo* and *in vitro*”, Russian Journal of Genetics. 44 (3): 273-278 (2008)
6. Yüzbaşıoğlu D, Ünal F., Yılmaz S., Aksoy H., Çelik M., “Genotoxicity Testing of Flucanazole *In Vivo* and *In Vitro*”, Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis). 649 (1-2): 155-160 (2008).
7. Yılmaz S., Ünal F., Yüzbaşıoğlu D., Aksoy H., “Clastogenic Effects of Food Additive Citric Acid in Human Peripheral Lymphocytes”, Cytotechnology. 56 (2): 137-144. (2008).
8. Yılmaz S., Ünal F., Aksoy H., Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., “Cytogenetic effects of citric acid and benzoic acid on *Allium* chromosomes”, Fresenius Environmental Bulletin. Düzeltmede (2008).

B) Özeti Basılmış Uluslar Arası Kongre Tebliğleri

1. Yılmaz, S., Çelik, M., Aksoy, H., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., “Genotoxicity studies on the fungicide Hexacanazole in Mouse bone-marrow cells”, II. International Enviromental Protection Symposium, 8-10 September, Kütahya, (2005).
2. Aksoy, H., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., “Genotoxicity Study in Lymphocytes of Offset Printing Workers”, II. International Enviromental Protection Symposium, 8-10 September, Kütahya, (2005).

3. Demir, H., Ünal, F., Yılmaz, S., Çelik, M., Yüzbaşıoğlu, D., “*In vitro* testing for genotoxicity of the insecticide Methidathion”, II. International Environmental Protection Symposium, 8-10 September, Kütahya, (2005).
4. Tarhan, G. H., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S., “*In vitro* genotoxic effects of Fluoxetine”, II. International Environmental Protection Symposium, 8-10 September, Kütahya, (2005).
5. Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., “Screening of food additive Benzoic Acid for its genotoxic properties in human lymphocytes in culture”, 36. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society, Prague, Czech Republic, 2-6 July 2006.
6. Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy H., Çelik M., Ünal, F., Yılmaz, S., “*In vivo* and *in vitro* genotoxicity testing of the antifungal drug Triflucan”, 36. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. 2-6 July 2006, Prague, Czech Republic.
7. Ünal, F., Yılmaz, S., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy H., Çelik M., “Genotoxicity of Vantex-A Pyrethroid Insecticide in mammalian cells”, 36. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. 2-6 July 2006, Prague, Czech Republic.
8. Ünal, F., Kaplan U, Yılmaz, S., Yüzbaşıoğlu, D., “Sister Chromatid Exchange and Micronuclei in Human Peripheral Lymphocytes Treated with Diclofop-Methyl *in vitro*”, 37. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. 9-13 September 2007, Basel, Switzerland.
9. Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy H., Yüzbaşıoğlu, D. Çelik M., “Assessment of Phosphoric Acid Genotoxicity in Human Peripheral Lymphocytes *in vitro*” 37. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. 9-13 September 2007, Basel, Switzerland.
10. Yılmaz, S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy H., “Clastogenic Effects of Four Food Additives in Human Lymphocytes *in vitro*” 37. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. 9-13 September 2007, Basel, Switzerland.

11. Yüzbaşıoğlu, D., Özkan D., Ünal F., Yılmaz S., Aksoy H., “Evaluation of Cytogenetic and DNA Damage Induced by the Organophosphate Insecticide Acephate”, 37. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society. 9-13 September 2007, Basel, Switzerland.

C) Özeti Basılmış Ulusal Kongre Tebliğleri

1. Yüzbaşıoğlu, D., Ünal F., Çelik, M., Yılmaz S., “Afugan fungusitinin *Allium cepa* L. kök ucu hücrelerinde ve kültürdeki insan periferik lenfosit hücrelerinde sitogenetik etkileri”. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2004.
2. Yılmaz S., Ünal F., “Sitrik asidin (Gıda katkı maddesi) *Allium sativum* L. kök ucu hücrelerinde ve insan periferik lenfosit kültüründe etkileri”. XVII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2004.
3. Ünal, F., Yılmaz S., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., Çelik M., “Benzoik Asidin *A. Sativum* (L.) Kök Ucu Hücrelerinde Sitogenetik Etkileri”. XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2006.
4. Demir, H., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., Yılmaz S., Çelik M., “Triadimenol Fungisitinin *In vitro* Genotoksik Etkileri”, XVIII. Ulusal Biyoloji Kongresi, Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın, 2006.
5. Mamur, S., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz S., Potasyum Sorbatın Kardeş Kromatit Değişimi, Kromozomal Anormallik ve Comet Testleri ile Genotoksik Etkilerinin Belirlenmesi. XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.
6. Yılmaz S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Aksoy, H., Çelik, M. Metominostrobin ve Emamectin Benzoate Pestisitlerinin *In vitro* Genotoksik Etkileri. XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.
7. Yılmaz S., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D. Kalsiyum Propiyonatın İnsan Periferik Lenfositlerinde *In vitro* Genotoksik Etkileri. XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.

8. Taner, G., Ünal, F., Yüzbaşıoğlu, D., Yılmaz, S. Lipoik Asit ve Ferulik Asitin İnsan Lenfosit Kültüründe Mitomisin-C'ye Karşı Antigenotoksik Etkileri. XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.
9. Özkan, D., Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Yılmaz, S., Aksoy, H., Mephosfolan İnsektisitinin *in vitro* Genotoksik Etkileri. XIX. Ulusal Biyoloji Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2008.

D) Atıflar

1. Atıf alan Makale: Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., Yılmaz S., Ünal F., Aksoy H. Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis) 604 (1-2): 53-59 2006.

Atıf Yapan: Stagos D, Spanou C, Margariti M, et al. Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY 55 (13): 5246-5252 JUN 27 2007.

2. Atıf alan Makale: Yüzbaşıoğlu D., Çelik M., Yılmaz S., Ünal F., Aksoy H. Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes. Mutation Research (Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis) 604 (1-2): 53-59 2006.

Atıf Yapan: Turkez H. Effects of boric acid and borax on titanium dioxide genotoxicity. JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY.